

ÓBUDAI EGYETEM
ÓBUDA UNIVERSITY

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

BÁNYAI ANITA

RÉSZECSCKE ÉS SEJTSZEPARÁCIÓS MÓDSZEREK VIZSGÁLATA ÉS ALKALMAZÁSA MIKROFLUIDIKAI RENDSZERBEN

Témavezetők:

Dr. Fürjes Péter

Varga Máté (ipari konzulens)

Tartalomjegyzék

1.	Abstract.....	4
2.	Kivonat.....	5
3.	Célkitűzések.....	6
4.	Bevezetés, szakirodalmi áttekintés	9
4.1	Mikrofluidika megjelenése, fejlődése, és gazdasági térnyerése	9
4.2	Mikrofluidikai jelenségek alapvető fizikája.....	12
4.3	Szeperálási módszerek mikrofluidikai rendszerekben	14
4.4	A legfontosabb aktív szeperálási módszerek és működési alapelveik	16
4.4.1	Elektromos erőter indukált elválasztási módszerek.....	16
4.4.2	Akusztó- és termoforetikus elválasztási módszerek.....	18
4.4.2.1	Tömbi akusztikus állóhullám (Bulk acoustic standing waves – BAW)	18
4.4.2.2	Felületi akusztikus hullám (Surface acoustic waves – SAW).....	19
4.4.2.3	Termoforetikus elválasztás	21
4.4.3	Optikai manipuláció – fókuszált lézernyalá bbal.....	21
4.4.4	Magnetoforézis.....	22
4.5	Passzív szegregációs módszerek és kihívásaik.....	28
4.5.1	Determinisztikus oldalirányú térítés alapja, és alkalmazása	28
4.5.1.1	A DLD szeperáció elméleti háttere, a geometria hatásai	29
4.5.1.2	Biológiai minták szeperációja DLD módszerrel	32
4.5.2	A keresztáramlásos szeperációs módszer alapjai és alkalmazási területei	36
4.5.3	A laterális részecskefókuszálás mikrofluidikai rendszerben	40
4.5.3.1	A laterális részecskefókuszálás elméleti háttere	42
4.5.3.2	Sejtalk jelentősége a laterális fókuszálás szempontjából	44
4.6	Irodalmi összegzés	48
4.7	Mikrofluidikai rendszerek anyagválasztéka	49
4.8	Minta mozgató mikrofluidikai rendszerekben.....	50
5.	Módszertan	51
5.1	Mikrofluidikai szerkezetek kialakítása lágy litográfiával	51
5.2	Képfeldolgozás.....	54
5.3	Sejtszámlálás.....	56
5.4	Reagensek.....	57
5.5	Áramlástan folyamatok modellezése végeelem módszerekkel	57
5.5.1	A CFD problémák numerikus megoldására alkalmazható szoftverek	58
5.5.2	Végelem modellek a kísérleti elrendezések leírására	59
6.	Eredmények.....	60
6.1	Determinisztikus oldal irányú térítés	60

6.1.1	Oszlopalak hatása a részecskeszeparáció hatékonyságára	62
6.1.2	Az áramlási sebességtér hatása a részecskemozgatásra DLD rendszerekben	66
6.1.3	Biológiai minta viselkedése DLD rendszerben	68
6.2	Keresztáramlású szűrés	70
6.2.1	Keresztcsatornás szűrés eredményei	72
6.2.2	Gát típusú elrendezés eredményei	75
6.3	Laterális fókuszálás	78
6.3.1	Szimmetrikus, periodikusan változó keresztmetszetű mikrofluidikai csatornák	78
6.3.2	Aszimmetrikus, periodikusan változó keresztmetszetű mikrofluidikai csatornák	80
6.3.3	Részecskék viselkedésének vizsgálata végeelem szimulációval	81
6.3.4	Kísérleti adatok feldolgozása és összevetése a szimulációs eredményekkel	81
6.3.5	Dean örvények laterális eltolódásának szimulációja	82
6.3.6	Áramlási sebesség hatása a részecskék fókuszálására.....	85
6.3.7	A mikrofluidikai hullámcsatorna hosszváltoztatásának a hatása	88
6.3.8	A mikrofluidikai csatorna oldalarányainak hatása a szeparációra	88
6.3.9	A H50_Wcr50 és H25_Wcr50 típusú mikrofluidikai hullámcsatornák vizsgálata	90
6.3.10	Laterális fókuszáló mikrofluidikai rendszer optimalizálásának eredménye	92
6.3.11	Élő sejtek viselkedése periodikusan változó keresztmetszetű kanyarulatós mikrofluidikai csatornában	93
6.4	Mágneses szeparáció	99
6.4.1	Kísérleti elrendezés és beállítás optimalizálása	99
6.4.2	Kísérleti és szimulációs eredmények összehasonlítása	101
6.4.3	A mágneses szeparáció hatékonysága mikrofluidikai környezetben	104
7.	Összefoglalás	106
7.1	Determinisztikus oldal irányú eltérítés	107
7.2	Keresztáramlásos szűrés	108
7.3	Laterális fókuszálás	109
7.4	Mágneses szeparáció	110
8.	Eredmények hasznosíthatósága	111
9.	Publikációs jegyzék	113
9.1	Tézisek alapjául szolgáló publikációk	113
9.2	Konferencia publikációk	113
9.3	Egyéb publikációk	113
10.	Köszönetnyilvánítás	114
11.	Irodalomjegyzék.....	115
12.	Függelék.....	125
13.	Nyilatkozatok	130

Rövidítések jegyzéke

BAW	Tömbi akusztikus állóhullám (Bulk acoustic standing waves)
BIOMEMS	Bio-Mikroelektromechanikai rendszerek (Bio-MicroElectroMechanical System)
bis-Zn-DPA	cink-koordinált bisz(dipikolilamin)
CAGR	Ciklikus Növekedés (Compound Annual Growth Rate)
CEpCs	Cirkuláris Epitheliális Tumor Sejtek
CFD	Számítási folyadékdinamika (Computational Fluid Dynamics)
CFF	Keresztáramú szűrés (Crossflow filtration)
CFM	Folyamatos áramlású mikrofluidika (Continous Flow Microfluidics)
CFU	Telepképző egység (Colony Forming Unit)
COC	Ciklikus Olefin Copolimer
COP	Ciklikus Olefin Polimer
DEP	Dielektroforézis
DLD	Determinisztikus Oldal Irányú Térítés (Deterministic Lateral Displacement)
FACS	Fluoreszcencia aktivált sejtszeparálás (Fluorescent-activated Cell Sorting)
FDA	Amerikai Élelmiszer és Gyógyszeripari Hivatal
FVM	Végeselem Módszer (Final Volume Methode)
GP	General Practitioner – Házi Orvos
HSA	Humán Szérum Albumin
IMS	Immunomágneses Szeparálás
IVD	In Vitro Diagnosztika
LF	Laterális Fókuszálás
LOC	Lab-On-a-Chip
MACS	Mágnes – Aktivált – Sejtszeparálás
MAP	Magnetoforézis
MB	Mágneses gyöngyök
MBL	Mannóz Kötött Lektinek
MEMS	Mikroelektromechanikai Rendszerek
NIR	Közeli Infravörös (Near InfraRed)
PBS	Pufferált Sóoldat
PCR	Polimeráz Láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PDE	Parciális Differencia Egyenlet (Partial Differential Equation)
PDMS	Polidimetil-Sziloxán
PEO	Poli(Etilén-Oxid)
PMMA	Poli(metil-metakrilát)
POCT	Point-of-Care tesztelés
PS	Polisztirol
RSV	Respiratórikus Szinciciális Vírus
RUBA	Gyors Húgyúti Baktérium Elemző Készülék (Rapid Urine Bacteria Analyzer)
SAW	Felületi Akusztikus Hullám (Surface Acoustic Wave)
SSAW	Felületi Akusztikus Állóhullámok (Standing Surface Acoustic Waves)
TSAW	Haladó Felületi Akusztikus Hullámok (Traveling Surface Acoustic Waves)
μTAS	Miniatürizált Teljes Analitikai Rendszerek (Micro Total Analysis System)

1. Abstract

In the field of microfluidics, the rise of the Lab-on-a-chip (LOC) or "miniaturized total analytical systems" (μ -TAS) in medical diagnostic applications have played a prominent role over the past decades, and thus the Point-of-Care (POC) platforms as a primary *in vitro* diagnostic systems that utilize the LOC solutions at the patient's bedside, in ambulances or even in GP offices.

Good examples for the utilization of the LOC systems in the medical technology industry are the continuous blood sugar level metering, the monitoring of the different stages of the various cardio- or cerebrovascular disasters – heart attack, stroke – or even the identification and differentiation of bacterial and viral infections. The primary aims of these POC rapid tests were represented by the Covid pandemic era at the best: provide valuable results within a short period of time from a sample volume of a few nanos to hundreds of microliters with high reliability. This can facilitate the isolation of the infected patients in time and reduce the possibility of further infections or support the medical decision-making process.

This is a multidisciplinary field, in which technological challenges are not only coming from the manufacturing and integration steps, but also from the nano- and micro-scale environment, where there is a significant change in the surface-to-volume ratio, therefore the role and their impact of the capillary and surface forces becoming dominant against the bulk forces. Due to the laminar flow in the microfluidic channels, it is necessary to use such geometric units that can effectively implement sample injection, liquid transport, mixing of reagents, under reasonable incubation and reaction time. After the sample preparation, the detection of the segregated target is performed in most cases by optical, electrical, electrochemical or nanomechanical methods.

In my research study, I specifically focused on the different particle separation methods, primarily on the passive solutions that are based on hydrodynamic principles like: (1) *deterministic lateral displacement* (DLD), (2) *lateral focusing* (LF) and (3) *crossflow filtration* (CF). The advantage of these methods is that they are capable of performing the size-based particle separation by combining the geometric parameters of the channels with the flow factors (flow velocity and pressure conditions) without the need of any external force field (electric, magnetic etc.).

Relying on purely passive separation methods, the composition and viscosity of the target cells and the medium, the concentration of the different components, their deformability, various morphology and their orientation in the flow can significantly influence the efficiency of the filtration. On the other hand, the active methods, like (4) the *magnetophoretic separation*, involve an external force field (e.g. magnetic) that is able to separate the targeted particles from a larger sample volume (bulk solution) with the help of functionalized magnetic beads with target specific antibodies. During my research study, I investigated the effectivity of the magnetic separation in different fluidic setups varying the channels geometric parameters and structure designs with the support of neodymium magnets. The experimental results have been compared to the ones are received from finite element simulations. My aim is to investigate the different particle separation methods, compare their effectivity and limitations and to set up a proposal for the useful separation methods in an integrated fluidic unit.

2. Kivonat

A mikrofluidika területén különösen nagy szerepet kapott az elmúlt évtizedek során az orvosdiagnosztikai alkalmazásokra fejlesztett Lab-on-a-chip (LOC) vagy „miniatürizált teljes analitikai rendszerek” (μ -TAS) térnyerése; így mára a Point-of-care (POC) *in vitro* orvosdiagnosztikai eszközök az elsődleges applikációs csoport, amely az LOC technológiát hasznosítja betegágy mellett, mentőkocsikban, vagy épp orvosi rendelőkben.

Ilyen LOC rendszereket használnak cukorbetegség esetén a folyamatos vércukorszint ellenőrzésére, a kardio- vagy cerebrovaszkuláris katasztrófák - szívinfarktus, sztrók- stádiumának beazonosítására, a gyors lefolyású bakteriális vagy vírusos fertőzések kimutatására is. A Covid pandémia alatt nélkülözhetetlenné vált gyors tesztek példája szemlélteti leginkább ezen eszközök elsődleges célját: rövid időn belül, akár néhány nano vagy mikroliter térfogatú mintából, gyors, hatékony, és megbízható analitikai eredmények szolgáltatása, amely akár hozzájárulhat a beteg időben történő izolációjához a további fertőzések lehetőségének csökkentéséhez, vagy támogathatja az orvosi döntéshozatalt is.

Egy olyan multidiszciplináris területről beszélünk, melyben nemcsak a technológiai megmunkálási és integrálási lépések okoznak kihívásokat, hanem a nano- és mikroskálán, a felület-térfogat arány jelentős megváltozása is, ahol a dominánssá váló kapilláris és felületi erők szerepe jelentősebb a térfogati erőkhöz képest. A mikrofluidikai csatornában jelentkező lamináris áramlás miatt olyan geometriai egységeket kell alkalmazni, amelyekkel megvalósul a mintainjektálás, folyadék transzport, a reagensek- illetve a minta keveredése, megfelelő inkubációs és reakció idők betartásával. Végül a mintaelőkészítést követően a szegregált célminta kimutatása a szenzor zónában többnyire optikai, elektromos, elektrokémiai vagy nanomechanikai módszerrel valósul meg.

Kutatásom során elsősorban a mintaelőkészítés kategóriájába eső szeparációs feladatokkal foglalkoztam, a hidrodinamikai elveken alapuló passzív megoldásnak számító (1) *oldal irányú eltérítési* (DLD), (2) a *laterális fókuszálási* (LF) és a (3) *keresztirányú szűrési* (CF) technológiákkal, mely módszerek előnye, hogy külső erőter alkalmazása nélkül, pusztán geometriai megfontolások, áramlástani tényezők (áramlási sebesség, nyomásviszonyok) kombinálásával, a folyadék tehetetlenségéből adódó hidrodinamikai erők teszik lehetővé a méret alapú szeparálást. Tisztán passzív szeparálási módszerekre hagyatkozva a célminta sejtek és a médium összetétele, viszkozitása, az egyes alkotóelemek koncentrációja, változatos morfológiája, deformálhatósága és áramlásban felvett orientációja jelentősen befolyásolhatja a szűrés hatékonyságát. Ezzel szemben a szeparálást segítő külső – pl. mágneses - erőter bevonásával, már aktív módszernek számító (4) *magnetoforetikus csapdázás* lehetővé teszi, hogy nagyobb mintatérfogatból, célminta-specifikus antitesttel kezelt mágneses gyöngyök segítségével tisztán a célmintát szeparáljuk. Kutatásom során neodímium mágnes alkalmazásával és a mikrofluidikai csatornák geometriai elemeinek és méreteinek kombinálásával vizsgáltam a csapdázási hatékonyságot. A kapott eredményeket összevettem végeelem szimulációs eredményekkel. Célom, hogy megvizsgáljam az egyes módszereket, összevessem azok hatékonyságát, megismerjem azok limitációit és ajánlást tegyek a hatékony szeparálási módszerek alkalmazására egy integrált fluidikai egységben.

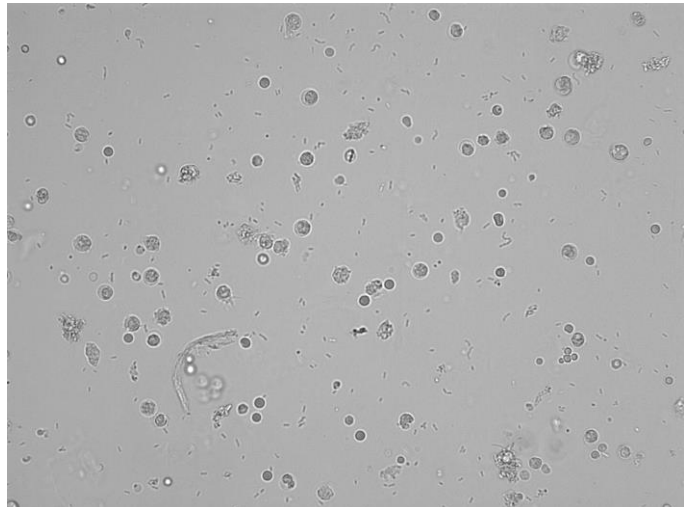
3. Célkitűzések

Kutatómunkám során alkalmazott szeparációs módszerek kiválasztásánál fontos szempontként szolgált a későbbi diagnosztikai rendszerbe történő integrálhatóság, a hordozhatóság, melynek kiemelt aspektusa a mikrofluidikai rendszer geometriai és anyagszerkezeti tulajdonságainak tervezése és vizsgálata – az ipari alkalmazásokkal összhangban.

A 77 Elektronika Kft. által kezdeményezett Gyors húgyúti baktérium elemző készülék fejlesztése (RUBA – Rapid Urine Bacteria Analyzer) kapcsán merült fel az igény egy olyan mikrofluidikai eszköz kivitelezésére, mely alkalmas mintaelőkészítésre, -szállításra, célminta dúsításra, illetve alakos elemek szeparálására, azok laterális pozicionálására az érzékelő zóna fölött. Mintaoldatként a Newtoni folyadékként viselkedő vizeletet tekintettük, melyet a legtöbb mérés során vizes oldattal elegyített polisztirol részecskékkel vagy puffert (PBS) oldatba kevert sejtekkel modelleztünk.

A vizelet pH-ja (5-8), összetétele, a benne található alakos részecskék mérete és morfológiája változatos (1. ábra). Megtalálható benne:

- vörösvértest (7-10 μm),
- fehérvérsejt (8-15 μm),
- laphámsejtek (~ 40-60 μm),
kis kerek hámsejtek (~ 10-40 μm),
- cylinderek a vese szövetéből
(szemcsés és hyalin ~10-40-60 μm),
- baktériumok különböző formában:
pálcika (BACr, ~2-4 μm)
illetve Coccus (BACc, ~1-2 μm),
- kristályok (Ca-oxalát, Mg, foszfát és
húgysavkristályok ~ 5-20-40 μm),
- gomba (~7-50 μm),
- nyák, valamint spermium (~20-30 μm).



1. ábra: Vizelet összetétele

A célunk, hogy az integrálható mikrofluidikai mintaelőkészítő rendszer alkalmas legyen a baktériumok mérettartományán kívül eső, a későbbi mérési feladatokat befolyásoló alakos elemek szűrésére, elválasztására. Az elválasztási módszerek alapparamétereit elsősorban méretbeli korlátozások mentén lett tervezve, figyelembe véve a választott megoldások áteresztőképességét, hatékonyságát, robusztusságát, más műveleti egységgel való összeépíthetőségét, integrálhatóságát is.

A tanulmányban szereplő és kísérletek során alkalmazott szeparációs eljárások kiválasztásának háttérében húzódó indokok között kiemelkedő, hogy a mikrofluidikai eszközben rövid idő alatt (< 30 perc) viszonylag nagy mintamennyiséget (~1 ml) kell átszűrni.

A vizeletben meglehetősen nagy a sejtek méret és alak szerinti változatossága, így egy többlépcsős szűrési elrendezés kialakítását képzeltem el, mely a vizeletben található alakos elemeket (60 – 1 μm) nagy felbontással, robusztus módon képes szeparálni, viszont a < 4 μm

mérettartományban a célminta mennyiségi veszteségét korlátozza. Így a mérések során külön vizsgált fluidikai egységek egybeépíthetősége is fontos szempontként jelent meg. Egyszer használatos, eldobható fluidikai eszköz kialakítást szem előtt tartva további cél volt a felhasználói beavatkozás minimalizálása, a felesleges minta kazettában történő tárolhatósága. Ennek megfelelően az olyan technológiai megfontolások, melyek nagyobb folyadékmennyiséget igényeltek nem jöhettek szóba. A mintaelőkészítést, szállítást, pozicionálást egy fluidikai pumpával meghajtott eszközben terveztük kivitelezni, elsősorban jelölésmentes, passzív szeparálási módszerek felhasználásával, és optikai detektálás alkalmazása mellett.

Kutatásaim során négy szeparálási módszerre tértem ki részletesebben, hogy vizsgáljam a tervezett mikrofluidikai egységek geometriai megfontolásait, teljesítőképességét, illetve javaslatot tegyek azok optimális működési feltételeire.

1. Determinisztikus oldalirányú eltérítés:

A DLD egy passzív elven működő részecskeszeparációs módszer, melynél a kialakított periodikus oszloprendszer paramétereivel olyan cut-off érték határozható meg, mely méret szerint képes klaszter csoportokat elválasztani a változatos méreteloszlással rendelkező részecskepopulációból. A módszer alkalmazása során kihívást jelent a lágy sejtek deformálhatósága, így sok esetben azok indukált mozgásformáival igyekeznek javítani a méret alapján történő osztályozást. Tervezés során vizsgálom több oszlopalak szeparálási jelenségre gyakorolt hatását, illetve az abból származó áramlási anizotrópia jelenségéből adódó, hatékonyságot befolyásoló tényezőket. Ezen kívül javaslatot teszek azok javítását szolgáló geometriai elrendezésre.

2. Laterális fókuszálás

Laterális fókuszálást megvalósítani képes periodikus mikrofluidikai rendszerek vizsgálata során a csatorna-geometria intenzív parametrizálása mellett kísérleti úton elemzem a különböző méretű polisztiirén gyöngyök koncentrációjának mértékét, illetve a részecske méretétől függő fókuszálódási pozíciókat a tervezett fluidikákban. A kísérleti eredményeket végezem szimulációs modellekkel vetem össze, vizsgálva 1) az áramlási sebesség, 2) a csatorna keresztmetszet, illetve 3) a fluidika hosszának (periódusok számának) változtatásával járó lehetőségeket. Tanulmányomban vizsgálom a csatornakeresztmetszet és az alkalmazott áramlási sebesség által befolyásolt Dean örvények hatását a fókuszálási pozícióra. Javaslatot teszek olyan csatorna-geometriára, mely széles mérettartományban képes sejtek pozicionálására. Célom volt, hogy definiáljak egy részecskeméret alapú „térképet”, amely útmutatást ad a szeparációs, fókuszáló mikrofluidikai rendszer alkalmazhatóságát tekintve valós sejtek esetén is. A tervem, hogy modellként szolgáló fluoreszcens gyöngyök viselkedésén keresztül következtessenek a különböző méretű és morfológiájú sejtek fókuszálhatóságára. Ezek közös tulajdonsága, hogy méretüket tekintve több dimenziósak, rugalmasabbak, ezért áramlásban változatosabb alakot és mozgásformát vehetnek fel, mint a rigid gyöngyök. További kérdésként merülhet fel, hogy az ekvivalens részecskeméreteket alapján következtethetünk-e az egyes sejtek fókuszálódásra ható, mikrofluidikai rendszerben felvett mozgásformáira.

3. Keresztáramlásos szűrés

Egyszerűbb, kis méretű részecskék áteresztését biztosító szűrési feladatok elvégzésére alkalmas, keresztáramlásos szűrésen alapuló mikrofluidikai rendszert tervezem és vizsgálom. Két jellegzetes morfológiai megoldást: az oszlopos, illetve a duzzasztógát típusú szűrőszerkezet hatékonyságát vizsgáltam azok hatékonyságának szempontjából. Célom, hogy azonosítsam a szűrő felület geometriai jellemzőinek és a csatornák keresztmetszetének – ezáltal a kialakuló nyomásviszonyok – hatását a szűrletben megjelenő célrészecske mennyiségére és a szűrlet tisztaságára. Elemzem a minta összetételének hatását a szűrés hatékonyságára. A mérési eredmények alapján javaslatot teszek egy megfelelő geometriára, kiterve az integrálhatóság lehetőségeire.

4. Mágneses csapdázás

Aktív szeparációs módszerek közül a magnetoforetikus elválasztás mikrofluidikai rendszerben való megvalósítását vizsgálom. Ebben az esetben a célrészecskék mágneses jelölésére van szükség, kísérleteimben a jelölő mágneses nanogyöngyök viselkedését vizsgálom különböző áramlási viszonyok között, minél nagyobb csapdázási hatékonyság elérését célozva. A szűrési feladatok megvalósítása során elsődleges szempont a nagy áteresztőképesség és a hatékonyság biztosítása, azonban az áramlási sebesség növelése sok esetben rontja a célminta csapdázhatóságát. Olyan geometriai inhomogenitásokat alkalmazok a mikrofluidikai rendszerben, melyek nagyobb globális áramlási sebesség esetén is javítani tudják a csapdázási hatékonyságot az áramlási tér lokális módosításával. A kísérleti eredményeket összevetem FEM szimulációs módszerek eredményeivel. A javasolt lokális csapdázási megoldások autonóm mikrofluidikai rendszerekben is alkalmazásra kerülnek.

Igyekszem teljeskörű betekintést nyújtani a mikrofluidikai rendszerekben alkalmazható szeparációs technológiák alkalmazási lehetőségeibe, és azok előnyeit és hátrányait bemutatva olyan módszert javasolni és vizsgálni, amely a RUBA projekt érdekeivel és követelményeivel egybeesik.

4. Bevezetés, szakirodalmi áttekintés

4.1 Mikrofluidika megjelenése, fejlődése, és gazdasági térnyerése

A mikrofluidika megjelenése, fejlődése és mai állása elsősorban a hatvanas években, a félvezető gyártástechnológiában bekövetkezett robbanás szerű fejlődésének köszönhető. Jack Kilby nevéhez fűzhető az az 1964-es szabadalom, melyért 2000-ben Nobel díjat kapott: a fotolitográfia – integrált áramkörök gyártástechnológiájának kidolgozásáért, melyet a mikroelektronikában a „szilícium kor” kezdetének is jegyeznek. [1] A MEMS – mikroelektromechanikai rendszerek 100 nm és 1000 μm közötti méretskálán mozognak, új lehetőségeket nyújtott fizikai, kémiai, és biológiai szenzorok és aktuátorok alkalmazásában. Így a MEMS rendszerektől nem elkülöníthető módon, Richard G. Sweet [2] által 1965-ben nyilvánosságra hozott tintasugaras nyomtatót tartják a mikrofluidikai rendszerek elődjének.

Az évek során a mikrofluidikai rendszerek fejlesztése mögött több motiváció állt [3], melyre hatással volt a mikroanalitikai módszerek fejlődése; a hidegháború és a kémiai, biológiai fenyegetettség kimutatására fejlesztett eszközök; a Humán genom projekt és az ehhez köthető DNS szekvenálási módszerek fejlesztése és egyre inkább célorientált megoldásokkal, mint a sejtenyészési feladatokat megvalósító Organ-on-Chip technológia, vagy az analitikai megoldásokra specializálódott Lab-on-a-Chip módszerek. Elterjedtek az élelmiszeriparban, gyógyszerfejlesztésben, biokémiai applikációkban – mint a vércukorszint/inzulin rezisztencia mérő fejlesztések, a patogén detekciós eljárásokban a polimeráz láncreakción (PCR) alapú tesztek-, a bioaffinitás alapú tesztek, Next-generációs szekvenálási módszerek fluidikai alkalmazása csökkentette a költségeket és katalizálta azok elterjedését.

A 'miniaturized Total Analysis System' (μ -TAS) rendszerek vagy a 'Point-of-care' diagnosztikai tesztek (POC) olyan miniaturizált vagy kis méretű eszközök, melyek elsősorban az orvosdiagnosztikában bevett laborigényes kimutatásokat váltják ki, gyors az ellátás helyszínén elvégezhető vizsgálatokkal, olyan korlátozott infrastruktúrával rendelkező helyszíneken, mint például rohamkocsikban, betegágy mellett vagy éppen az alapellátásban. Ezen megoldások nemcsak a páciens jóllétét szolgáló rendszerek, hanem olyan diagnosztikai eljárások, amelyek nagyban segítik az orvosi döntéshozatalt a differenciál diagnózis folyamatában, jelentősen lerövidítve a terápiás döntéshozatalhoz szükséges időt, így költséget és végső soron emberéleteket mentve.

Egy ilyen labordiagnosztikai eszközöknek a részletes feladatai közé tartozik a minta gyűjtése, szállítása, valamint előkészítése, egy miniaturizált, integrált mechanikai-, kémiai-, bioszenzorokat tartalmazó rendszerben, így képes a mintában fellelhető cél molekulák vagy sejtek minőségi és mennyiségi kimutatására. [4]

World Health Organization adatai alapján [5] 2019-ben világszerte regisztrált 55,4 millió halálesetből 55 %-ban a top 10 vezető megbetegedés volt a felelős – úgy mint kardiovaszkuláris és daganatos megbetegedések, virális és bakteriális fertőzések, valamint újszülöttkorban felmerülő felmerülő komplikációk – fertőzés, koraszülés komplikációk.

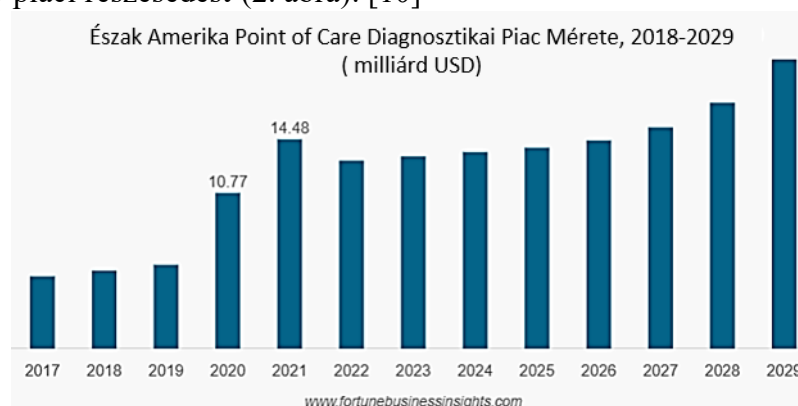
Az infrastrukturális fejlődések, a globalizáció lehetővé tették a gyors szállítmányozást, tömegközlekedést a világ szinte bármely pontjáról már néhány óra alatt. Globalizáció gazdasági jelentősége vitathatatlan, de óhatatlan következménye a járványok gyors terjedésének és világjárványokká történő terebélyesedésének (lásd. SARS-COV-2 járvány).

A járványok megnövekedett kockázata miatt olyan nagy áteresztőképességű, gyors és olcsó analitikai megoldásokra nőtt meg az igény, melyek lehetővé teszik egy betegség jelenlétének vagy súlyosságának gyors, hatékony és pontos kimutatását.

A Globális Mikrofluidikai Piac 2021-es anyag kimutatásai alapján a piacból Észak-Amerika (35%), Európa (25%), és Ázsia csendes-óceáni régiója (20%) rendelkezik a legnagyobb részesedéssel, míg a világ többi része a piac legkisebb hányadán osztozik [6, o. 2023–2030]. A gyógyszerészeti-, biotechnológiai-, gyógyszeradagolók, klinikai diagnosztika és egyéb alkalmazásokon túl 2021-ben a legnagyobb bevétellel a Point-of-care Tesztelés (POCT) állt az első helyen.

Market Business Insight (MBI) az előrejelzése alapján a 2021-ben 19,15 milliárd dollárra becsülte a globális mikrofluidikai piacot, ami évi 15,8%-os növekedési rátával (CAGR) számolva 2030-ra elérheti a 61 milliárd dollárt. [7] Markets and Markets kimutatásai alapján 2021-ben a piac nyeresége 20,7 milliárd USD volt, és egy ambiciózusabb, 23,2%-os növekedéssel számolva már 2026-ra 58,8 milliárd USD bevételt jósolt [8], TechNavio 2022-2026-ra 19,42%-os növekedést jelzett előre a globális mikrofluidikai piacnak [9].

Az In-vitro Diagnosztika (IVD) eszközök globális piacának alakulását F. Hoffmann-La Roche Ltd., Abbott Laboratories, Thermo Fisher Scientific Inc., Sysmex Corporation jelenléte és piaci fejlesztése befolyásolta leginkább a Covid-19 pandémia kitörését követően; 2019 -ről 2020-ra a globális IVD piac 25,2%-os növekményre tett szert, 2021-ben elérte a 92,08 milliárd USD értéket, és egy kisebb, 6%-os CAGR növekménnyel számolva 2022-ről 2029-re a piac elérheti a 107,42 milliárd USD piaci részesedést (2. ábra). [10]

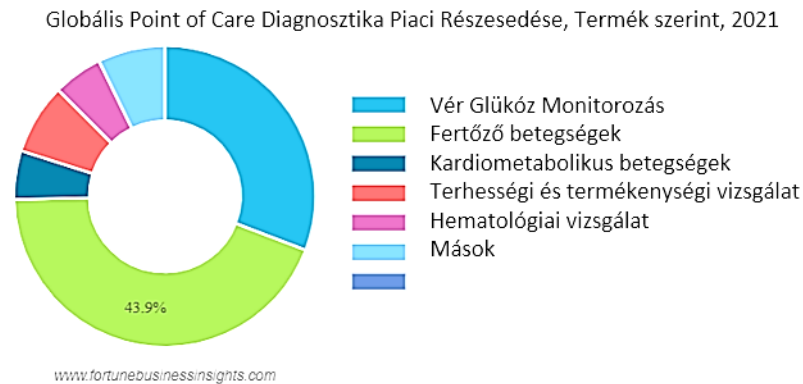


2. ábra: POC diagnosztika piaci részesedése Észak Amerikában 2018-2029-es előrejelzések szerint.

A piacot alakító nagyobb cégek 2019 és 2020 között komoly bevételektől estek el az immunodiagnosztika területén, melyhez hozzájárulhatott a termelési láncok leállása, áremelkedések, szállítási korlátok és egyéb okok. Ezzel párhuzamosan fokozatosan nőtt az igény a COVID-19 tovaterjedésének visszaszorítására, az öntesztelésre: a POC, valamint IVD gyorsteszték

térnyerésére. Új fejlesztések, gyors tesztek jelentek meg, elsősorban a reagensek és kitek újításában voltak főbb előrelépések a nagyobb szakértelmet igénylő műszeres fejlesztésekkel szemben.

A Fortune and Business kimutatásai alapján a POC gyors tesztek alkalmazási területének legnagyobb hányadát: 43,9 %-át a fertőző betegségek szűrése tette ki 2021-ben, mint a SARS-CoV-2 vírus, tuberkulózis, respiratorikus szinciciális vírus (RSV), HIV, hepatitisz, diftéria fejlesztett tesztek (3. ábra). [10]



3. ábra: Fortune and Business kimutatásai alapján a POC gyors tesztek alkalmazási területei

A COVID-19 pandémia katalizátorként működött a POC gyors tesztek elterjedésében, azonban a 2022-2029-es időszakban egyes elemzők már többféle forgatókönyvet vesznek számításba. Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság (FDA) a pandémiát követő időszakban több mint 350 diagnosztikai -molekuláris, antigén, antitest alapú- tesztet hagyott jóvá a COVID-19 tesztelésére, 2021 nyarán már több mint 500, 2022 telére már ~ 700 POC COVID gyors teszt volt forgalomban, ennek ellenére 2029-es évekre a piac mérséklődésével számolnak. 2021-ben 46,76 milliárd USD-re becsült globális COVID-19 diagnosztika piac alakulása két esélyes: 1) vagy egy jelentősen csökkenéssel fog szembenézni a pandémia lecsengésével (CAGR - 13,1%), 2) vagy az újabb járványoktól tartva folytatni fogja 'ciklikus növekedését'(CAGR -2,9%). [11]

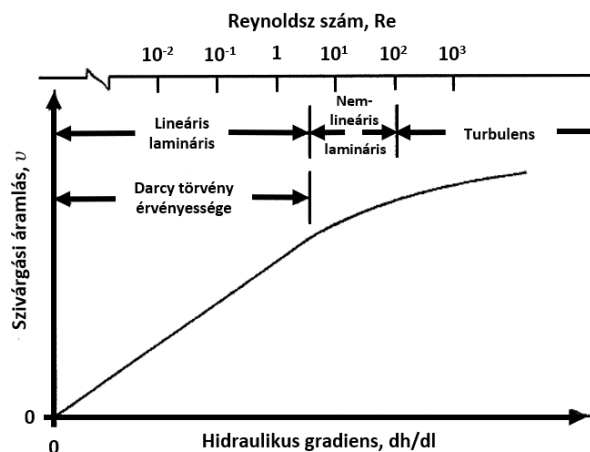
Ugyan a pandémia lecsengésével a COVID-19 tesztek globális piaca mérséklődik, továbbra sem szűnik meg az igény a mikrofluidikai fejlesztések iránt. A Global Industry Analysts üzleti jelentése alapján a Lab-on-chip technológia globális piaca 2030-ra megduplázódhat, 9,4% növekedési rátával számolva a 2022-2030-as időszakban 6,2 milliárd USD bevételről 12,7 milliárd USD-ra nőhet. [12]

Az egyre jobb minőségű (pontosabb, érzékenyebb) gyors tesztek, az öntesztelés terjedése fokozatosan komoly terhet vesz le az egészségügyi központok válláról, így a hordozható platformok fejlesztésére irányuló törekvések várhatóan a pandémia lecsengését követően sem fog megszűnni.

4.2 Mikrofluidikai jelenségek alapvető fizikája

A makroszkopikus világban tapasztalt jelenségekkel szemben mikro- és nanoskálán a felület és térfogat arány jelentős megváltozásával az áramlásban a tehetetlenségi erőkkel szemben a viszkózus erők javára dől a mérleg.

Henry Darcy francia hadmérnök publikálta először kísérleteit 1856-ban, melyben a felszín alatti vizek mozgásának jellegét vizsgálta porózus közegben. Megfigyelései később a Darcy törvényként (4. ábra) váltak ismertté, mely leírja a fajlagos térfogatáram ($v = \frac{Q}{A} (1)$, a térfogatáram és a csatornafelület hányadosa) és a hidraulikai gradiens (két folyadékoszlop magasságkülönbségének és távolságának hányadosa) összefüggését. Ezek permeábilis közegben egymással arányosak, de összefüggésük csak alacsony Reynolds számok (Re), vagyis csak alacsony áramlási sebességek esetén igaz. [13]



4. ábra: Darcy törvény összefüggése [13]

Osborne Reynolds ír születésű matematikus 1883-ban bemutatott kísérlete alapozta meg az áramlástan alapjait, melyben áramlási sebesség emelésével, fluidikai cső középpontjába vezetett, megfestett vízszögél viselkedését vizsgálta, megfigyelve a lamináris áramlásból, örvénylő, turbulens átmenetet mutató áramlásformákat. Tiszteletére, az áramlás jellemzésére bevezetett dimenzió nélküli szám - mely a viszkózus és tehetetlenségi erők arányát adja meg; a geometria és az áramlási viszonyok függvényében – a Reynolds – szám (Re) elnevezést kapta.

$$Re = \frac{\rho \cdot V \cdot L}{\mu} \quad (2)$$

, ahol ρ – folyadék sűrűsége, μ - viszkozitás, V - karakterisztikus áramlási sebesség, L karakterisztikus csatorna hossz. Egy kritikus Reynolds szám került meghatározásra: $Re=2100$ [14], mely alatt uralkodó viszkózuserők hatására lamináris áramlás jellemző; érték felett, azonban a túlsúlyba kerülő tehetetlenségi erők miatt már turbulens az áramlás. A mikrofluidikai csatornákra jellemző csatorna magasság tartománya (1 - 100 μm), a néhány $\mu\text{l/s}$ -os térfogatáram, valamint a vizes oldatokra jellemző alacsony kinematikai viszkozitás (víz $10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$), tízes nagyságrendbe eső Reynolds számot eredményez [15]. Mivel ez messze a kritikus Reynolds szám alatt van, lamináris áramlásról beszélhetünk. Ennek a stabil lamináris áramlásnak jellemzője a parabolikus áramlásprofil, melyben a falak mentén lassabb, csatorna közepén gyorsabb áramlás jellemezi a

rendszert. Keveredés csak diffúzió révén valósulhat meg, így bizonyos mintakezelési eljárások során olyan geometriák kialakítását kell alkalmazni, melyek mikroskálán is biztosítani képesek a folyadékrétegek közti átjárást, elegyedést, vagy adott részecskék szegregálását .

A mikrofluidikai rendszerekben fellépő áramlási jelenségeket a Navier-Stokes-differenciál egyenletek írják le, amelyek azzal az alapfeltevéssel élnek, hogy folyékony közegben az anyagokra fellépő feszültség egy az anyag viszkozitásából fakadó diffúziós és egy nyomás összetevőből áll. Az egyenletek jelentősége, hogy használatukkal számos gyakorlati áramlási alkalmazás leírható és modellezhető úgy, mint az óceáni áramlások, az időjárás, a repülőgépek szárnyai körül fellépő áramlások; mikrofluidikai alkalmazható a véráramlási kör vagy akár adott csatornakeresztmetszetű csőrendszerben fellépő jelenségek szemléltetésére.

A **Navier-Stokes** [15] és a **kontinuitás egyenlet**, ahol az [16] előbbi a momentum, utóbbi a tömeg konzerválásáért felelős:

$$\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} = -\frac{1}{\rho} \nabla p + \nu \nabla^2 \mathbf{v} + \mathbf{g} \quad (3)$$

ahol folyadék paraméterei ν - a sebesség, p - a nyomás, ρ - sűrűség, \mathbf{g} - a gravitációs térerő vektora, ν - kinematikai viszkozitás. Az egyenletet egyik oldalon az inerciális erők, másik oldalon pedig a nyomásgradiens, a viszkózus erők, és a folyadékra ható külső erők állnak. A kontinuitás egyenlet:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{v}) = 0 \quad (4)$$

Aszerint, hogy lamináris vagy turbulens áramlási körülményekről van szó (alacsony vagy magasabb Reynolds szám, illetve a folyadék összenyomhatóságától, viszkozitásától függően (jellemzően Newtoni vagy nem Newtoni folyadéknak tekinthető-e a minta, amit a megfelelő Mach-szám jellemez) egyszerűsödhet, vagy bonyolódhat az egyenlet. Az alapvető esetekben egy biológiai minta kezelhető Newtoni folyadékként.

A **Stokes – törvény** az áramlásban mozgó gyöngyök mozgását, pályavonalait írja le:

$$\frac{d}{dt} (m_p \mathbf{v}_p) = 3\pi\mu d_p (\mathbf{v} - \mathbf{v}_p) \quad (5)$$

ahol m_p - a részecske tömege, \mathbf{v}_p - a részecske sebessége, μ - a folyadék dinamikai viszkozitása, d_p - a részecske átmérője.

4.3 Szeparálási módszerek mikrofluidikai rendszerekben

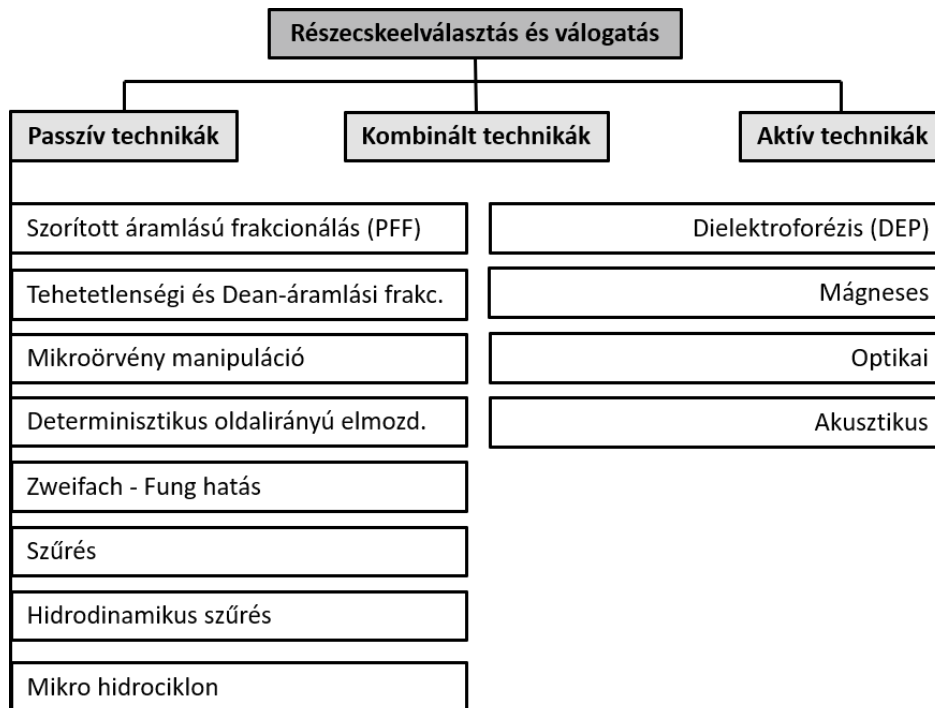
Biológiai mintákat vizsgáló eszközökben (pl. orvosdiagnosztika, gyógyszerhatóanyag fejlesztés, sejtanalízis) számos esetben szükség van mintaelőkészítési lépésre. Az elválasztandó alkotóelem, vagy analit lehet az a célminta, melyet vizsgálni szeretnénk, például egy adott gyógyszerhatóanyagra (rezisztencia vizsgálat, gyógyszerfejlesztés) vagy meghatározni annak koncentráció szintjét nagy pontossággal és érzékenységgel (diagnosztika). Ilyenkor az analitot szükséges elválasztani a zavaró, mintában megtalálható egyéb alkotóelemektől, vagy térfogatból koncentrálni egy adott szenzor felülethez.

A szeparációs mikrofluidikai eszközök alkalmazásával szemben alapvető elvárás a részecskék és sejtek szeparálási idejének csökkentése, illetve a szeparálás hatásfokának növelése. A célminta megfelelő tulajdonságok szerinti elválasztása még mindig jelentős kihívást jelent, habár a mikroszkopikus méretek miatt jelentős fizikai és kémiai változás hozható létre minimális térfogatokon belül is. A szeparálást elősegítheti a megfigyelt minta jelölése (pl. fluoreszcens festék vagy fehérje, fluoreszcens és/vagy mágneses nano- mikrogyöngy stb.). Ha például egy sejtet immunospecifikusan mágnesezhető gyöngyökhöz kötjük, majd mágneses erőterbe helyezük, lehetőség nyílik a jelölt sejt vagy konjugátum nagy pontosságú, hatékonyságú manipulálására. A specifikus jelölés azonban plusz egy járulékos lépés a mintapreparációban, amely így növeli az assay bonyolultságát, annak kezelési idejét és költségét. A jelölésmentes sejtszeparálás előnye, hogy nem igényel komolyabb mintaelőkészítést; a sejtek fizikai variabilitása – méret, alak, sűrűség, rugalmasság, polarizálhatóság – adja a megkülönböztethetőség alapját. Munkám során elsősorban a jelölés mentes módszerekre kerestem megoldást – kifejezetten sejtek hatékony elválasztását célozva.

Egy multidimenziós célsejt áramlásban felvett helyzetére, orientációjára, alakjára több egyéb tényező is hatással lehet, melyet Timm Krueger et al. [17] DLD technológiával végzett szeparáció során bizonyított: a maláriával fertőzött vörösvértestek rigidebbé váltak, és deformálhatóságuk megváltozása elegendő volt ahhoz, hogy elkülönítse a fertőzött populációt az egészségesektől. **A biológiai minták szeparációjának komplexitását tükrözi, hogy egy „apró” változás mekkora következményekkel jár a mikronos, szubmikronos tartományban.**

A mikrofluidikai alapú részecske és sejtszeparációs megoldásokat alapvetően az esetleges külső terek alkalmazása alapján passzív és aktív módszerekként azonosíthatjuk. Az aktív elválasztási módszerek külső erőforrást igényelnek, viszont ezek egy passzív módszert kiegészítve, vagy csupán önmagukban is, jelentősen növelhetik a szeparáció hatásfokát. A passzív szeparálási módszerek azért közkedveltek, mert nem szükséges a fluidika működtetése mellett egyéb külső erőforrás, ami egyszerűbbé és hordozhatóbbá teszi az analitikai platformot – viszont a fluidika geometriai paraméterezése komoly körütekintést igényel.

P. Sajeesh et al. [18] munkájában összegezte a napjainkban, mikrofluidikai területén alkalmazott, és elterjedt szeparálásra módszereket (5. ábra) kitérve mindkét megközelítés jelentőségére.



5. ábra: Mikrofluidikai szeparációs eljárások osztályozása [18]

Gyakorlati alkalmazásokban az (1) determinisztikus oldalirányú elmozdulás (DLD), és a (2) tehetetlenségi és Dean-áramlás alapú szeparálás kategóriájába tartozó laterális fókuszálást (LF), illetve a (3) hidrodinamikai szűrés kategóriájába tartozó - kereszt irányú szűrést (CF) fogom bemutatni, majd ezek után az aktív módszerek közé tartozó (4) magnetoforetikus csapdázást. Az alábbi fejezetben azonban röviden az olyan aktív szeparálási módszerek elméleti hátterére, kihívásaira és alkalmazhatóságára is kitérek, mint az akusztoforetikus-, optikai-, mágneses- és dielektroforetikus (DEP) szeparálás, különösen a szubmikron (<1 μm) tartományban megvalósítható **változatos alakkal jellemezhető sejtek szűrésére** keresve megoldást. A pálcika alakú E. coli baktérium részben ebbe a tartományba tartozik 1-2 μm hosszával és akár 0,25 μm átmérőjével. [19]

4.4 A legfontosabb aktív szeparálási módszerek és működési alapelvek

C. Wyatt Shields IV et al. [20] összefoglaló cikkében összegezte az aktív szeparációs módszerek lehetőségeit, de Tianlon Zhang et al. [21] tért ki a módszerek szubmikron tartományban történő alkalmazhatóságára. Általánosságban elmondható, hogy a hatékonyabb szeparálás érdekében csökkentenünk kell a fluidikai csatornák jellemző keresztmetszetét, azonban ezzel párhuzamosan romlik a platform áteresztőképessége, és megnő a minta kezelési ideje. Az áramlási sebesség növelése kompenzálhatja ezt a hátrányt, azonban az aktív szeparációs módszer hatásfokának romlása nélkül csak korlátozott mértékben. Jellemzően a legalacsonyabb áramlási sebességek az optikai módszerekhez szükségesek. Áteresztőképesség szempontjából egy fokkal jobban teljesítenek az akusztoforetikus módszerek, míg a legmegbízhatóbban a dielektroforetikus (DEP) módszerek alkalmazhatók magasabb áramlási sebességek mellett. Megadható egy alsó mérettartomány is, melyben az egyes elválasztási módszerek még alkalmazhatóak; ez alapján is a DEP módszer foglalja el a legelőnyösebb helyet a ranglistán, ahogy azt az 1. táblázat összefoglalja. [21]

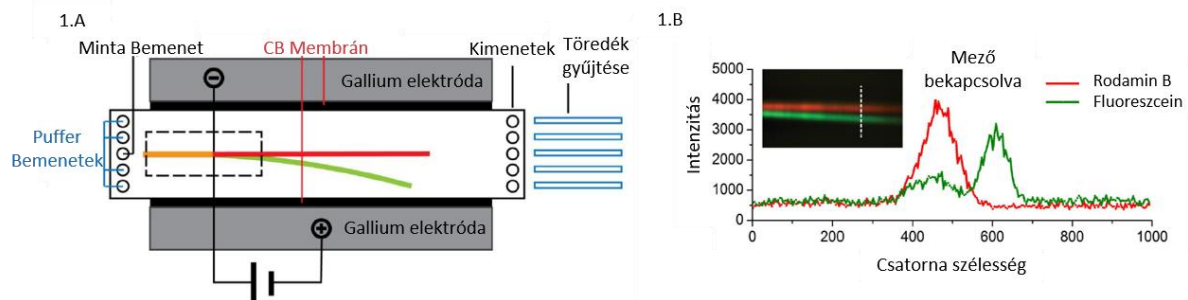
Áramlási sebesség	optikai módszer 0,24 nl/min	<	akusztoforézis ~0,2 µl/min	<	thermoforézis, DEP: ~24-25 µl/min [22]	<	magnetoforézis 120 µl/ min [23]
Effektív minimális méret	akusztoforézis: 0,11 µm	>	optikai módszer, thermoforézis: 0,1 µm [24] [22]	>	magnetoforézis (mágneses gyöngy Ø0,01 – 0,02 µm) [25]	>	DEP: 0,002 µm [26] [27]

1. táblázat Az egyes aktív szeparációs módszerek effektív sebesség és mérettartománya.

4.4.1 Elektromos erőtér indukált elválasztási módszerek

Elektroforézis [20] [28] alapú elválasztási módszer alkalmazása során megfelelő előfeszítés hatására a töltéssel rendelkező részecskék az elektromos erőtérben elmozdulnak az ellentétes töltésű elektródák irányába. A kialakuló elektroforetikus erő nagysága arányos a részecske töltésével és az előfeszítés (elektromos potenciál) nagyságával.

Xiaotong Fu et al. [28] mikrofluidikai rendszerekben is kivitelezhető módszer alkalmazását mutatta be. Szabad áramlási zónás elektroforézis (FFZE) (6. ábra) esetén az áramlásban levő molekulák, haladási irányukra merőlegesen alkalmazott elektromos erőtérben töltésüknek megfelelő mértékben és irányban, egy adott szögben eltérülnek. A megvalósított fluidikában a mintát (fluoreszcein és Rodamin B, 0,5 µl/min áramlási sebesség) középre fókuszálták a csatorna két oldalán áramló elektrolit (HEPES puffer és kinhidron oldatában (2 µl/min áramlási sebesség) segítségével. 80 V előfeszítés mellett a negatív töltésű fluoreszcein (zöld), a pozitív töltésű anód felé térült, míg a semleges Rodamin B (piros) fókuszáltan végig haladt a csatornában (6. B. ábra). Állandó feszültség alkalmazása során problémát okozhat az elektródákon megjelenő elektrolízis, amit szénrészecskékkel (korommal) módosított polidimetil-sziloxán (PDMS/CB) membrán használatával oldottak meg.



6. ábra FFZE (1.) alapkonceptiója és a hozzátartozó szerkezetek (1.A) sematikus ábrája; (1.B) elektromos mező bekapcsolásával a csatorna keresztmetszetben látható fluoreszcensen jelölt részecskék elkülönülése. [28]

Dielektroforézis (DEP) esetén a váltakozó feszültség hatására polarizálható sejtek manipulálásáról beszélünk. A dielektroforetikus erő (F_{DEP}) függ az elektromos mező térerősségétől (E), a részecske méretétől (R), a sejt és a folyadék tulajdonságaitól, valamint a Clausius-Mossotti faktortól (β) – ez utóbbi az effektív polarizálhatóságot adja meg a médium (m) és a részecskék (p) között, azok dielektromos permittivitása (ϵ), elektromos vezetőképessége (σ) és az elektromos mező szögfrekvenciája (ω) szerint. [21]

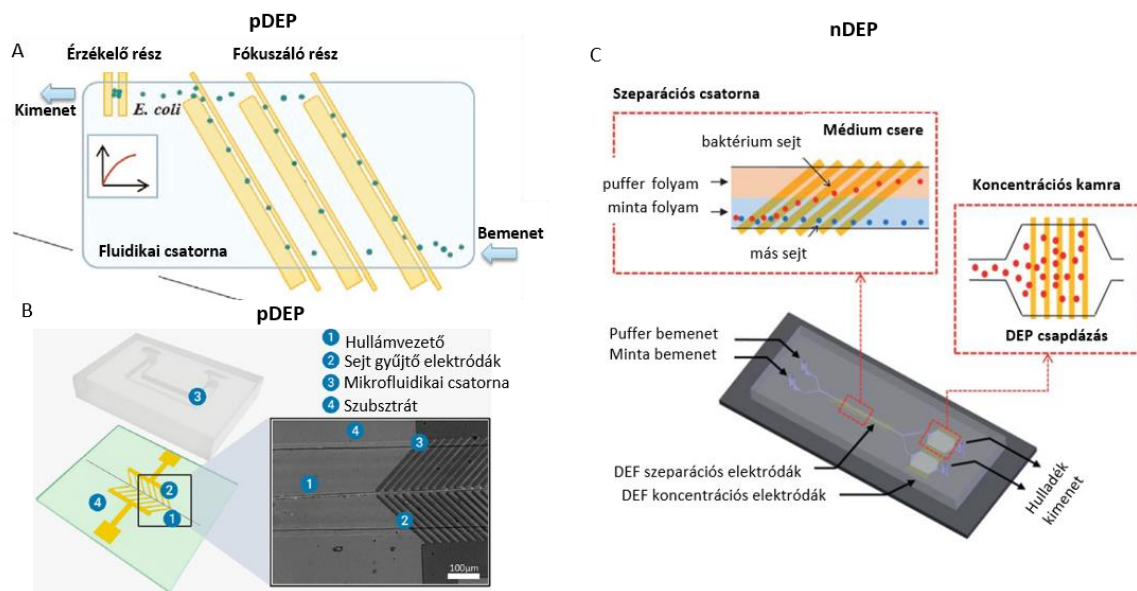
$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m R^3 \operatorname{Re}(\beta) \nabla E^2 \quad (6); \quad \beta = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + \epsilon_m^*} \quad (7); \quad \epsilon^* = \frac{i\sigma}{\omega} \quad (8)$$

Ha egy sejt polarizálhatóbb a médiumnál, akkor az pozitív dielektroforézissel (pDEP; $\operatorname{Re}(\beta) > 0$) a nagyobb térerősség irányába fog elmozdulni; ellenkező esetben – negatív dielektroforézis esetén (nDEP; $\operatorname{Re}(\beta) < 0$).

Myyoungon Kim et al. [29] a pozitív DEP jelenségét kihasználva (7. ábra A) ivóvízből szeparált – fókuszált és detektált *E. coli* baktériumot 100 μl mintából már 300 CFU/ml sejtszámtól. A cikkben leírt tanulságok szerint még ebben a médiumban is szükséges egy passzíváló réteg alkalmazása az elektródákon, valamint az elektródák sarkainak lekerekítése.

Dániel Petrovszki et al. [30] hasonlóan pDEP módszert használta ki (7. ábra B). Egy integrált mikrofluidikai rendszerben egy króm-arany rétegekből álló felületi elektródapárt, és egy 2 μm vastag negatív fotopolimerből álló bordás hullámvezetőt alkalmaztak elektródák közti 10 μm széles részben. Fecskendőpumpás áramoltatás (0,1; 3; 5 $\mu\text{l}/\text{min}$) és váltakozó feszültségű gerjesztés mellett (30 V_{p-p} 0,1-5 MHz) az *E. coli* baktériumok a felületi hullámvezető köré gyűltek. A pDEP elektróda rendszert egy integrált, felületi hullámvezető szenzoregységgel egybeépítve ezután meghatározták a baktériumok koncentrációját is, ahol a kicsatolt fény intenzitása és fáziseltolódásának mértéke arányos volt a hullámvezető szenzor egységre kikötött baktérium koncentrációjával. A módszerrel nem csak 10^2 - 10^6 CFU/ml *E. coli* jelenlétét tudták, de bebizonyították, a dielektroforetikus térőnek frekvencia és sejtméret függő jelváltozását, szelektivitását is.

Seungkyung Park et al. [31] nDEP módszerrel (7. ábra C) sikeresen különített el *E. coli* nagyobb vezetőképességű médiumokból is: PBS-sel 20x-ára hígított teljes vérmintából (1,54 S/m) és agy-gerincvelői folyadékból (1,8 S/m). A szeparáció hatásfoka médiumokra jellemzően 94,3%, illetve 87,2% volt. Végeelem szimulációkkal szemléltették, hogy egy részecske mozgása három dielektroforetikus erő egyensúlyának következménye (1) z irányú nDEP erő, 2) laterális nDEP erő, 3) lokális nDEP erő.



7. ábra: *E. coli* fókuszálásra és detektálásra használt platformok sematikus szerkezete: pDEP módszeren- (A) [29] és B) [30] valamint nDEP módszeren- (C) [31] alapuló elválasztási mikrofluidikai rendszerek.

Elektroosztatikus áramlás – állandó feszültség (DC) jelenlétében jön létre, ahol az oldatba kevert sejtek folyadék ionjaival együtt történő, elektromos tér által indukált migrációja megvalósul [20].

A módszer előnyei között említendő, hogy az aktív szeparációs lehetőségek között, az áramlási sebességek nagysága szerint a magnetoforetikus szeparálás után a 2. helyre sorolható (1. táblázat), és az effektív szeparálási méret tekintetében a legalacsonyabb tartományban, akár 0,002 μm méreteknél is alkalmazható a technológia. Azonban a DEP nem elterjedt módszer a felmerülő hátrányos jelenségek miatt, mint a vízbontás; a sejtek életképességét befolyásoló pH, valamint a káros hidrogén-peroxid fejlődés. További hátrány, hogy a vizeletben a pH (4,8 -7,4), az ozmolaritás (50-1300 mosm/kg) és az iontartalom (nátrium 25-200 mM; kálium 12-80 mM) jelentős tartományokban változik [32]. A médium ozmolaritásának változása az egyes klinikai mintákban jelentősen ronthatja a DEP módszerrel történő szeparálás hatékonyságát, a kísérleti alkalmazások során ezért sem erre a megoldásra esett a választás.

4.4.2 Akusztó- és termoforetikus elválasztási módszerek

Az akusztoforézis akusztikus nyomáshullámokkal kiváltott, a sejt életképességét nem befolyásoló migráció. Két főbb csoportra osztható: tömbi és felületi akusztikus állóhullámok alkalmazása szerint.

4.4.2.1 Tömbi akusztikus állóhullám (Bulk acoustic standing waves – BAW)

Akusztikus állóhullámok kialakulása esetén az egyes részecskék és sejtek jellegzetes tulajdonságaiknak megfelelően rendeződnek a csatornák keresztmetszetében. A részecskére ható erő nagyságát a sejt mérete, míg az erő irányát a közeg, illetve a sejt sűrűsége, összenyomhatósága befolyásolja. Ezek alapján megállapítható egy akusztikus kontraszt faktor (φ), amely ha pozitív értéket vesz fel, a sejt az állóhullám csomópontjának irányába, ellenkező esetben az ellentétes irányba fog mozogni [20]. Az alkalmazott frekvencia tartomány jellemzően 1-10 MHz.

M. Antfolk et al. [33] szimulációk során elemezte, hogy egy négyzet keresztmetszetű csatorna rezonanciája miként változik a frekvencia függvényében. A modellekben figyelembe vették az elsőrendű akusztikus nyomás, az akusztikus sugárzási erő és az áramlási sebességmező alakulását is, eszerint 0,5 μm átmérőjű gyöngyök akusztoforetikus pályáját számolták ki. A fókuszálást kétdimenziós félhullámhossz rezonancia esetén demonstrálták, amikor az akusztikus sugárzás mind a négy falat érintette, a falpárok között egy fázistolás (φ) jön létre. Kísérlet során vizsgálták az egydimenziós, illetve a kétdimenziós besugárzás által keltett fókuszálást (8. ábra 1.B) téglalap és négyzet keresztmetszetű csatornában. A legjobb hatást ez utóbbiban érték el: 1 és 0,6 μm átmérőjű gyöngyöket is sikeresen fókuszáltak egyetlen pontba. Élő organizmus esetén 90 %-nál is jobb hatásfokkal tudtak koncentrálni 10^9 db/ml E. coli baktériumot. Ebben a rendszerben az egydimenziós akusztikus fókuszálás alsó határa 1,6 μm ; ami alatt az akusztikus áramlás indukált húzóerő gátolja a kisebb részecskék fókuszálhatóságát.

4.4.2.2 Felületi akusztikus hullám (Surface acoustic waves – SAW)

A felületi akusztikus hullámok kialakításához elsősorban interdigitális transzducereket alkalmaznak, melyet egy piezo-elektromos szubsztrátra rögzítenek. Megfelelő meghajtás mellett a piezo-elektromos anyagban létrehozott periodikus deformáció indukálja a kialakuló hullámokat. Két üzemmód különböztethető meg: a haladó felületi akusztikus hullámok (TSAW – Travelling Surface Acoustic Waves) és a felületi akusztikus állóhullámok (SSAW - Standing Surface Acoustic Waves).

Haladó felületi akusztikus hullám (TSAW)

Ez a technika alkalmazható cseppgeneráláshoz [34], célminta koncentrációhoz [35], nanorészecskék keveréséhez [36, o. 3] is. G. Gestgeer et al. [37] a módszer alkalmazásával képes volt olyan poliszitirén gyöngyök szeparálására, melyek mérete csupán 200 nm-ben tért el egymástól (3 μm és 3,2 μm átmérőjű gyöngyök) (8. ábra). A részecskékre ható effektív akusztikus energia mértéke függ TSAW hullámhossz részecskeméretéhez viszonyított arányától (κ faktor), valamint a folyadék és a gömb alakú részecske sűrűségbeli különbségétől. A κ faktor:

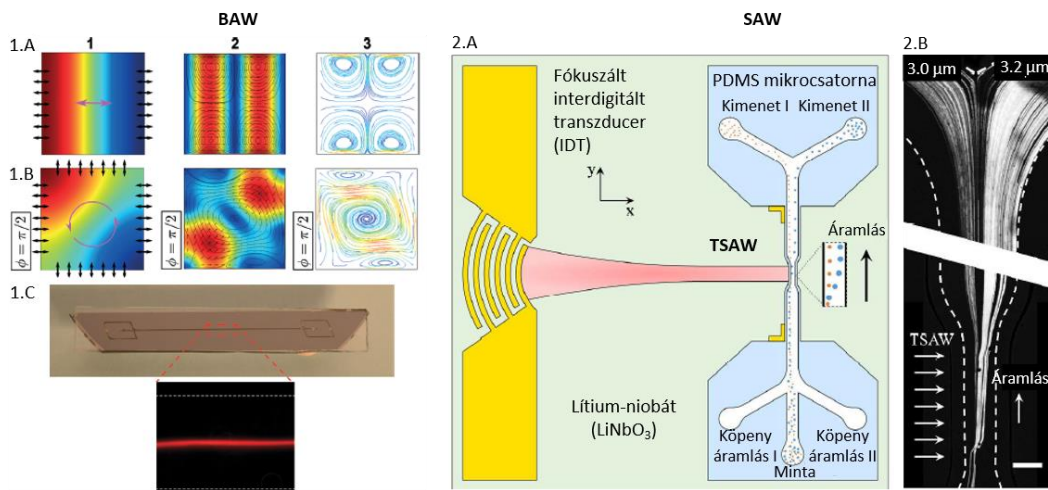
$$\kappa = a \frac{2\pi f}{c_f} \quad (9)$$

a részecske sugarának (a), a hullám frekvenciájának (f) és a folyadékban terjedő hang sebességének (c_f) – ismeretében megbecsülhető a szükséges akusztikus sugárzási energia, ami egy gömb alakú részecske lendületének megváltoztatásához szükséges ($\kappa \geq 1$ esetén). A transzducer működtetésekor a sík TSAW terjed a (pl. lítium-niobát) szubsztráton. A csatornának kellően szélesnek kellett lennie ahhoz, hogy a falakról visszaverődő hullámok ne befolyásolják a szeparálást. A képen (8. ábra 2.B) látható, ahogy a csatorna bal oldalára fókuszált gyöngyök már 0,2 μm méretbeli eltérés során is szeparálhatóak voltak. A TSAW hullámhossza 20 μm , alkalmazott frekvencia: 200 MHz, teljesítmény: 3,8 W volt.

A felületi akusztikus állóhullámok (SSAW)

A felületi akusztikus állóhullámok (SSAW) lényegében két egymással szemben elhelyezett interdigitális transzducer működtetésével keltett TSAW hullám interferenciájából keletkeznek. Amennyiben egyetlen csomópontot akarunk kialakítani a fluidikában, a csatorna szélességét úgy kell megválasztani, hogy az kisebb vagy egyenlő legyen a hang hullámhosszának felével. [37] Ez a módszer akusztikus csipeszként is funkcionálhat, mellyel alkalmas a sejt térbeli orientációjának módosítására. Az akusztikus erő nagysága (F_a) függ az akusztikus nyomástól (ρ), a részecske méretétől (átmérő - d); a médium (m) és a részecske (p) összenyomhatóságától (β), valamint azok sűrűségétől (ρ). Ezeken felül meghatározó még az alkalmazott ultrahang hullámhossza (λ), a távolság a nyomáshullámok csomópontjaitól (y), valamint az akusztikus kontraszt faktortól (ϕ). [20]

$$F_a = \frac{\pi^2 p^2 d^3}{12\lambda} \beta_m \phi \sin\left(\frac{4\pi}{\lambda} y\right) \quad (10); \quad \phi = \left(\frac{5\rho_p - 2\rho_m}{2\rho_p - \rho_m}\right) - \left(\frac{\beta_p}{\beta_m}\right) \quad (11)$$



8 ábra: BAW és SAW akusztoforetikus fókuszálás és részecskeszeparálás.

BAW: 0,5 μm -os részecskék mozgása négyzet keresztmetszetű csatornában: (1.A) Egydimenziós besugárzás és visszaverődés az egyik falpáron, fél hullámhossz rezonancia kialakulása. (1.B) Kétdimenziós besugárzás, mindkét falpár mentén. 1 – elsődrendű akusztikus nyomás; 2 – akusztikus besugárzási erő és az áramlási sebességmező áramvonalai; 3 – gyöngyök akusztoforetikus pályája. (1.C) 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ áramlási sebesség mellett fókuszált 0,5 μm -os gyöngyök a csatorna közepén. [23] **SAW:** (2.A) A szeparátor szerkezet sematikus felépítése. (2.B) 3 μm és 3,2 μm gyöngyök szeparálása. (skála: 200 μm) [27]

Az aktív szeparációs módszerek közül az akusztoforézis a lassabb áramlási sebességek mellett alkalmazható technikák közé sorolható (1. táblázat, 16.o.), így adott időegység alatt csak kisebb mintamennyiség kezelhető, mely gyors tesztek esetén kritikus paraméter. A megbízhatóság szempontjából nem elhanyagolható előnye, hogy nem olyan érzékeny a médium összetételére, az élő sejtek sérülékenysége sem kritikus, ugyanis a térítés akusztikus nyomáshullámokkal történik. A célminta sűrűsége, összenyomhatósága, vagy a médium ozmolaritásának változása az egyes klinikai mintákban kisebb hatással van a módszer hatékonyságára, mint a dielektroforetikus szeparálás esetén. Az irodalmi áttekintésben bemutatott részecske és sejtszeparációs módszerek közül az akusztoforetikus szeparálást tartanám még vizsgálatra alkalmasnak abban az esetben, ha vizeletben történik a mérés. A módszer alkalmas szeparálásra 0,11 μm [21] mérettartománytól, mely alkalmassá teszi a módszert E.coli baktérium kezelésére is.

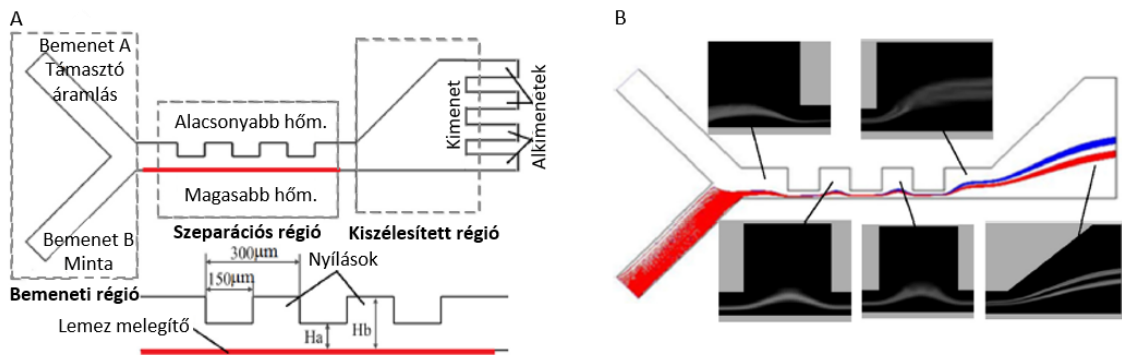
4.4.2.3 Termoforetikus elválasztás

Ez a szeparációs technika főleg, mikrométer alatti, azaz szubmikronos tartományban alkalmazható. Wang Ruijin et al. [38] egy olyan fluidikai rendszert tervezett (lásd 9. ábra), melyben a termoforézis hatására a részecskék méretük függvényében a nagyobb hőmérsékletű helyről az alacsonyabb felé mozdulnak el.

$$F_T = \frac{6\pi\mu_f^2 d_p}{\rho_f} C_s \frac{K_f}{K_p + 2K_f} \frac{\nabla T}{T} \quad (12)$$

A fenti (12.) egyenlet alapján megállapítható, hogy a termoforetikus erő nagysága függ: a folyadék és a részecske hővezetésétől (K_f és K_p); a folyadék hőmérsékletétől (T) és hőmérséklet gradiensétől. $C_s = 0,13$, konstans, amely az $1 \mu\text{m}$ nagyságú gyöngyökre érvényes. A μ_f a folyadék dinamikus viszkozitása; d_p a részecske átmérője; ρ_f a folyadék sűrűsége. Ennek megfelelően kisebb tömegű sejtek gyorsabb migrációt mutatnak.

A szeparálás mértéke 3 paraméter hangolásával állítható be ezek: (1) u_A/u_B a két bemeneti sebesség hányadosa, (2) a H_b/H_a a csatorna méretfluktuációjának mértéke, és a (3) ΔT hőmérséklet gradiens. A legjobb szeparálási hatásfok kisebb minta áramlási-sebesség ($u_B = 4 \text{ mm/s}$) és nagyobb hőmérséklet különbség ($\Delta T = 10 \text{ K}$) mellett érhető el.

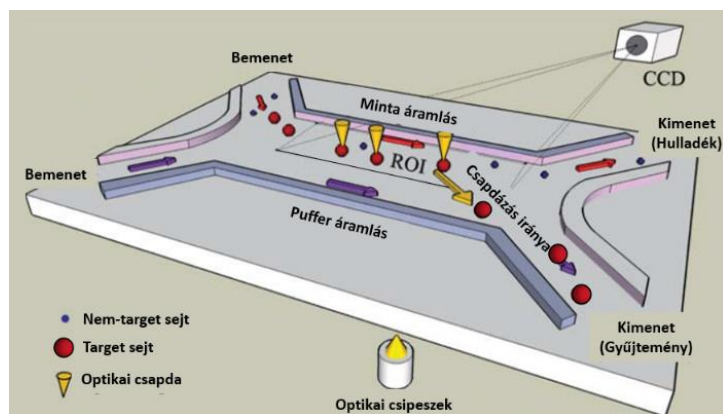


9. ábra: A) A termoforetikus elválasztást megvalósító eszköz geometriai felépítése, valamint B) az elválasztási folyamat minőségi összehasonlítása a numerikus és kísérleti eredmények alapján. A $0,5$ és $1,0 \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngyök szétválaszthatók mindössze három csatorna szűkület és tágulat után, $\Delta T = 5 \text{ K}$ esetén.

Kísérleti elrendezésben a termoforetikus módszer alkalmazása elvetésre került, ugyanis az elsősorban szubmikronos tartományban alkalmazható, így mindenképpen igényel egy jelentősebb előszűrést. A gyorsabb szeparálást elősegítő geometriai elrendezéssel a tümasztóáramlás extra folyadékmennyiség problémát okozna, valamint a biológiai minta hőmérsékletre való érzékenysége sem elhanyagolható szempont a mintasérülékenység szempontjából.

4.4.3 Optikai manipuláció – fókuszált lézernyalábbal

Sejtek csapdázása egy közel-infravörös (Near Infrared – NIR) lézer nyalább alkalmazásával is megvalósítható, mely a fény intenzitásprofiljának megfelelően képes egy adott fókuszpontban rögzíteni a részecskét a lézer kikapcsolásáig. A módszer alapja két optikai erő egyensúlyának alakulása. A szóródási erő a fényterjedés irányába tolja a részecskét, míg a gradiens erők a fényintenzitás térbeli gradiensének irányába húzzák a megfigyelt mintát. [39] Xiaoling Wang et al. [40] olyan módszert dolgozott ki, melynek segítségével élesztő sejteket ($\varnothing = 5\text{--}8 \mu\text{m}$), emberi embrió össejteket (hESC, $\varnothing = 10\text{--}15 \mu\text{m}$) választottak el fluoreszcens polisztirén gyöngyöktől ($\varnothing = 2 \mu\text{m}$).



10. ábra: Optikai csapdázás és sejtek mozgásának sematikus koncepciója [40]

Képfeldolgozó eljárással azonosították a sejteket méret és fluoreszcens jel alapján, majd áramlásban, a lézer mozgásával egyszerre több csapdát is kialakítva a célsejteket a minta oldatból a pufferbe vitték (10. ábra). A fluidikában kialakított áramlási sebességet ($67 \mu\text{m/s}$) és a sejtek az áramlásra merőleges mozgatási sebességét ($120 \mu\text{m/s}$) kombinálva, a sejteket 350 mW lézer alkalmazásával $137 \mu\text{m/s}$ sebességgel tudták mozgatni. A csapdák számának és a minta koncentrációjának függvényében $90 - 98 \%$ -os szeparálási hatékonyságot értek el.

A módszer hatékonysága jelentős, azonban a vizsgált aktív szeparálási módszerek közül a leglassabb eljárás (1. táblázat 16.o.). Az olyan klinikai alkalmazásokban, melyekben egyedi sejtek vizsgálatára van szükség kiváló lehetőséget jelenthet, azonban a mi elrendezésünkben a jelentős ($\sim 1 \text{ ml}$) mintamennyiség teljes átvizsgálása esetén a rendszer nem felelne meg a gyorsteszt kritériumának.

4.4.4 Magnetoforézis

A magnetoforézis jelenségét például vas tartalmú sejtek és részecskék mágneses térben történő csapdázása és eltérülése esetén tapasztalhatjuk. A mágneses tér kialakításához állandó mágnesset, elektromágneses tekercset, vagy ferromágneses mikrohuzalt is alkalmazhatnak. A kialakuló magnetoforetikus erő nagysága a mágneses térerősség mellett a mágneses részecske méretétől függ. A módszerrel elkülöníthetők vörösvértestek a vérplazmából, akár mágneses nanogyöngy jelöléssel, akár olyan módszerrel is, melyben ferromágneses folyadékban szuszpendált sejteket válogatnak azok mérete, alakja és deformálhatósága alapján. [20]

Mikrofluidikai módszereknél a legelterjedtebben alkalmazott mágnesek a neodímium vasbór mágnesek, melyek mágneses fluxussűrűsége elérheti az 500 mT -t a pólusoknál. Általában a csatorna teljes felületét lefedő mágneseket szoktak alkalmazni, de kisebb mágnessel, a lokális mágneses tér maximálásával mágneses csapda is kialakítható. [41]

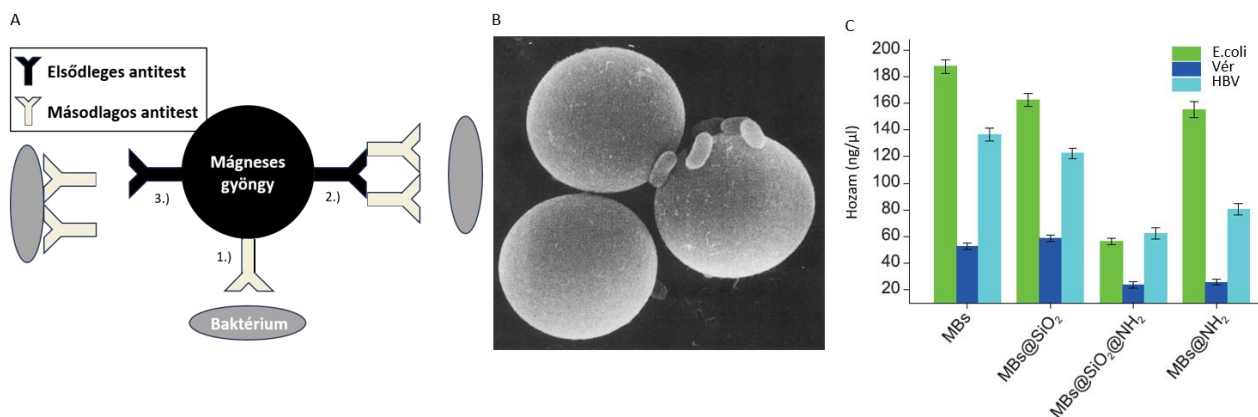
A mágneses gyöngyök felületére kötött antitestek képesek felismerni és specifikusan megkötni a célmolekulát vagy jelölt sejteket. Egy sejt felszíni antigénmolekulára specifikus antigén-antitest-mágneses nanorészecske konjugátumon keresztül kiválasztható a célsejt a mintából, de akár egyetlen sejthez több mágneses nanogyöngy is kapcsolható. Itt felmerülhetnek további, a sikeres kötést befolyásoló paraméterek is (antitest kötés K_d értéke, sztérikus gátlás, kötési affinitás stb.). [42]

A magnetoforetikus szeparálás előszeretettel alkalmazott módszer immunkémiában, immun-fluoreszcens jelöléses sejtanalízis technológiákhoz –vagy *in vitro* diagnosztikai rendszerek esetén is [43]. Eszerint a magnetoforetikus elválasztás kutatott és alkalmazott módszer, melynek elsődleges célja az érzékenység-, szelektivitás, áteresztőképesség növelése, valamint az ehhez szükséges idő csökkentése. Előnyei a költséghatékonysága, a szeparációs idő rövide; hátránya, hogy az alkalmazott kiértékelési módszert korlátozhatják.

Mágneses szeparálás során kihívások közé tartozik immunkémiai oldalról, hogy a gyöngymérettel változik annak felület-térfogat aránya. A kvantitatív kimutatások hatékonyságát nemcsak a részecske funkcionális ligandummal való borítottságának mértéke szabja meg, hanem annak orientációja, affinitása, és reaktivitása az adott célsejttel.

Mikrotechnológiai oldalról a legnagyobb fizikai kihívás a mágneses térerősség térbeli inhomogenitása, vagyis a csapdázás hatékonysága, függ a fluidikától vett távolságtól, a fluidikai csatorna paramétereitől, valamint az áramlási sebességtől. A Poiseuille törvény, és a parabolikus áramlási profil (lamináris áramlás) következménye, hogy a kialakuló nyírófeszültség miatt a falak mentén lassabb, a csatorna közepén gyorsabb a lokális áramlási sebesség, melyből adódóan a mágnes gyöngyökre ható eredő erő a falakmentén nagyobb, mint a csatorna közepén. A jelenség ellensúlyozására a csatornaalak optimalizálásával van lehetőség.

Immunomágneses szeparálás (IMS) során egy szuperparamágneses részecskét vonnak be olyan felismerő molekulával, mely a célsejt, vagy organelum felületi antigénje ellen köt. A módszer során a mágneses gyöngyöket direkt módon - elsődleges antitesten keresztül, vagy indirekt módon - egy másodlagos antitesten keresztül köthetők a célsejthez. (11. ábra A). A módszer limitáló tényezői: (1) az antitest és célminta között kialakuló kötés minősége, (2) az antigén megfelelő koncentrációban való jelenléte, (3) a mágneses gyöngyök megfelelő kémiai összetétele, (4) a mágneses tér megszűnésével a gyöngyök között kialakuló intermágneses erők fennléte (cél azok kizárása), (5) valamint a részecske felületkezelése, mely a megfelelő reaktivitást biztosítja megfelelő stabilitás mellett [44].



11. ábra: Mikroorganizmusok immunomágneses szeparálása. A) Specifikus antitest kötődésének lehetőségei: direkt módon (1.); másodlagos antitesten keresztül (2.), vagy a specifikus antitest (pl.: nyúl IgG) reagálhat először a célsejttel és aztán kötődhet a gyöngyökhöz a bevonatként használt bárány anti-nyúl IgG-on keresztül (3.). B) Páztázó elektronmikroszkóp alatt látható a bárány anti-nyúl IgG-vel borított Dynabead M450 ($\phi=4,5 \mu\text{m}$) mágneses gyöngy, melyhez másodlagos antitesten keresztül kötött az *Yersinia enterocolitica* – a humán bélrendszeri fertőzésekhez leggyakrabban köthető baktérium. [44] C) A mágneses gyöngyök (MBs) felszíni csoportjainak hatása a nuklein sav kinyerésre három féle mintából: *E. coli*, Vér- és HBV, vírussal fertőzött szérumból [45].

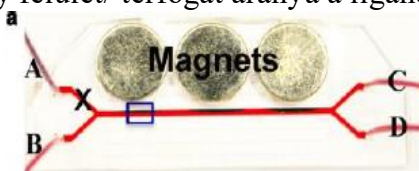
A teljes mágneses szeparálás jelentősen függ többek között a folyadék viszkozitásától, mágneses gyöngy méretétől, valamint a mágneses térerőtől.

Az alkalmazott mágneses gyöngyökkel szemben támasztott kritériumok: legyen kémiaiilag stabil, monodiszperz, és vizes médiumban jól elosztható, biokompatibilis, valamint hőkezelésnek ellenálló – éppen ezért a magnetit (Fe_3O_4) lett az egyik legelterjedtebb gyöngy alapanyag, a felületkezelési eljárások közül pedig a szilícium-dioxid és polimer bevonatra kidolgozott megoldások terjedtek el.

Ritka sejtek szeparálása szintén nagy kihívást jelent az orvoslásban (pl. cirkuláris epiteliális tumor sejtek; CEPCs, MCF7), különösen, ha az egy heterogén populációban kevesebb, mint 0,01%-ban van jelen. Nagy térfogatok vizsgálata miatt 10-100 ml/h áteresztésre van szükség, de a mikrofluidikai megoldások áteresztőképessége ennél jelentősen alacsonyabb (< 2 ml/h) [46]. Emiatt egyes kutatócsoportok a fluidika áteresztőképességének növelését célozták meg. K. Y. Castillo-Torres et al. 2020-ban írt publikációjában olyan eszközt mutattak be, mely E. colit képes szűrni 50-100 ml vízből, vagy nem-Newtoni folyadékként viselkedő hígítatlan vérből kevesebb, mint 15 perc alatt. [23] Mások a mágneses gyöngy és a célminta kötés specifikusságának növelését célozták meg szintén szepszist okozó baktériumok megkötésére, melyet lizozimmal kezelt gyöngyökkel 10 CFU/ml koncentrációban valósítottak meg [47]. Vizsgálták a mágneses gyöngy és a célsejt méretarányának szerepét, illetve olyan geometriai megfontolásokat vezettek be, melyek a jelölt részecskéket hozza minél közelebb a mágneses felületéhez [48].

Kulcsfontosságú a pontos analízis mellett a detektáláshoz szükséges idő is. Bo Li et al. [45] olyan kit-et fejlesztett, mellyel 5 percen belül képes sejtek lízisére és nukleinsavak extrakciójára. Kísérleteikhez E. coli szennyezett vérmintát és mellráksejteket használtak, négyféle funkcionálizálást vizsgáltak (kezeletlen, SiO_2 , $\text{SiO}_2 - \text{NH}_2$, NH_2) (1. ábra C), és hat féle gyöngyméretet alkalmaztak. A felületkezeletlen gyöngyökkel 97,41 ng/ μl hozamot értek el, a felületkezeltek közül a SiO_2 adta a legnagyobb hozamot, ami 85,07 ng/ μL volt. Nagyobb gyönggyel nagyobb hozamot értek el, 1 ml E. coli oldatból.

Jung-Jae Lee et al. [49] olyan módszert alkalmazott, melyben Fe_3O_4 mágneses nanogyöngyöket cink-koordinált bisz(dipikolilamin) (bis-Zn-DPA), szintetikus ligandummal módosítottak, hogy az specifikusan kössön az E. colihoz és Gramm-negatív baktériumokhoz. Jelentősen csökkenteni tudták a minta inkubációs idejét (<1 min) a korábbi, antitest-alapú rendszer inkubációs idejéhez képest (>30 min), és nagy áramlási sebesség mellett (60 ml/h) is képesek voltak megszűrni a vérmintát a baktériumoktól. A 100 nm átmérőjű, amin végekkel terminált gyöngyökhöz polietilén glikol láncokon keresztül kötötték a cinket (Zn^{2+}) és a bisz-dipikolilamint. A $\text{MNP}_{\text{PEG-PDA-Zn}}$ komplex nem sérülékeny, gyorsan köt a célmintához, elhanyagolható kölcsönhatásba lép a többi sejttel, és a gyöngyök nagy felület/ térfogat aránya a ligand kötő kapacitását növeli.

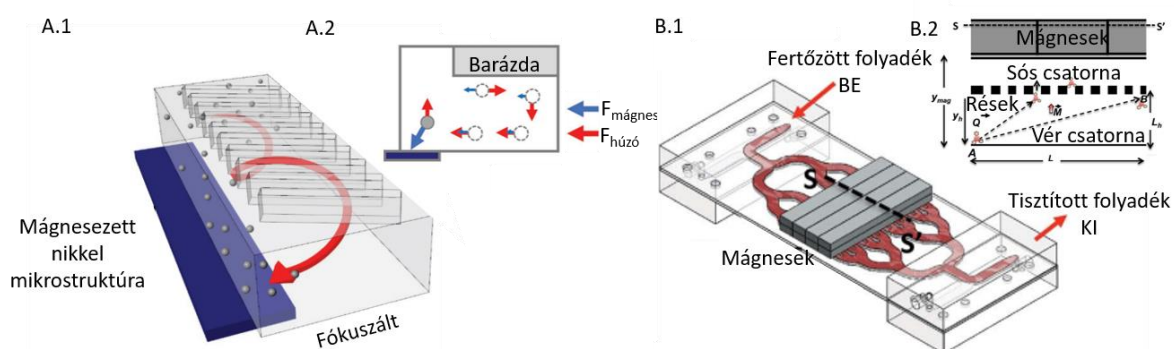


12. ábra: Mágneses szeparálás mikrofluidikai rendszerben. [49]

A szűrést egy 1000 μm széles és 200 μm magas fluidikai rendszerben végezték a csatorna mentén elhelyezett permanens mágnesekkel (12. ábra). Az *E. coli* koncentráció 1×10^6 CFU/ml, míg a gyöngy koncentráció 1×10^{11} /ml volt marha 2 ml vérmintába keverve. A fluidikában ciklusonként a baktériumok 88%-át sikerült kiválogatni. A módszer hátránya a nanogyöngyök telítik a mágnesek közelében a potenciális kontakt felületeket.

Su Hyun Jung et al. [48] olyan geometriát fejlesztettek, mely nem Newtoni folyadékként viselkedő, hígítatlan vérből képes 200 nm átmérőjű mágneses gyönggyel jelölt *E. coli* baktériumot szűrni 10^4 CFU/ml koncentrációból, 0,6 ml/h áramlási sebesség mellett, $91,68\% \pm 2,18\%$ szűrési hatékonysággal. Megoldásukat egy $1000 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 5 \text{cm}$ (széles \times magas \times hosszú) fluidikai csatornában hozták létre (13. ábra A). A rendszerben a spirális mozgást elősegítő másodlagos áramlás vezeti a gyöngyöket ferromágneses nikkell struktúra közelébe. Így a geometriával segített laterális migráció során a gyöngyök a nagyobb mágneses fluxussűrűség gradiens közelében csapdázódtak. A 10^4 CFU/ml *E. coli* manózzal kötött lektin paramágneses nanorészecskékkel szeparálták, melyet később sóoldatba fecskendeztek. Ebben a kisebb viszkozitású oldatban már $97,7\% \pm 0,93\%$ szeparálási hatékonyságot értek el.

Joo H. Kang et al. [50] másik irányból közelítették meg a szűrés hatékonyságának növelését. Kutatómunkájukban arra fókuszáltak, hogy a célrészecske hatékony megkötéséhez milyen optimális gyöngyméretet kell választani. A tesztelt gyöngyméretetek közül az 50 nm –es volt megfelelő, a mágneses szeparálás hatékonyság szempontjából. A kísérletek során a mágneses gyöngyöket manózzal kötött lektinnel (MBL) vonták be, mely képes többféle patogént, toxint felismerni. Egy 'Biospleen' mikrofluidikai csatornában (fordításban: 'biolép', 13. ábra B.) valósították meg a szűrést. Ez egy olyan fluidika, melyben a szűrés egy 27 mm hosszú csatornában, adott áramlási sebességgel áramoltatott mintából történik, a csatorna tetejére rögzített mágnesekkel.



12. ábra: A mágneses szeparálásra geometriai megoldások sematikus ábrája. A.1) A ferde gerincsorokkal integrált magnetoforetikus elválasztó berendezés rajza és A.2) a mikrofluidikus csatorna keresztmetszete és benne a mágneses részecskékre ható erők (kék nyilak: mágneses erő, piros nyilak: a forgó áramlás által indukált húzóerő). [48] B.1) Eszköz mágnesesen tisztítja a baktériumokkal szennyezett folyadékokat mágneses nanorészecskék bevonásával. B.2) Keresztmetszeti ábrázolás: $L = 27 \text{ mm}$, S -től S' -ig; a mágneses gyöngyökhöz kötött baktériumok áramlanak, miközben az alkalmazott mágneses erők v_{mag} sebességgel felfelé tereli őket. A mágneses leválasztás hatékonyságát (I_{mag}) baktérium-mágneses gyöngy komplexek határozták meg amelyek az A pozícióban lépnek be a csatornába, amely megköveteli a lehető legnagyobb keresztirányú vándorlási távolságot ($L_h = 600 \mu\text{m}$) a csatornán át a B pozíció felé Q (L/h) áramlási sebesség mellett. Ha az A pozíciót áthaladó baktériumok elérik a csatorna másik oldalát, mielőtt áthaladnának a B pozícióból, feltételezhetjük, hogy teljesen eltávolították őket a folyadékból ($I_{mag} = 100$). [50]

A fent bemutatott technológiák az aktív szeparálás széles palettáját lefedik. A kutatómunkám során elválasztási hatások alapján a dielektroforetikus, illetve a magnetoforetikus szeparálás alkalmazhatósága merült fel. A dielektroforetikus szeparálásnál komoly kihívást jelent a minta vezetőképessége, így az elektródák megfelelő szigetelése, a hordozhatóság, kivitelezhetőség miatt választásunk végül a **mágneses csapdázásra** esett. A magnetoforetikus csapdázás azért is előnyös, mert egyaránt alkalmazható a fecskendőpumpás és a kapillaris pumpásmegoldásokhoz. A felületkezelt mágneses gyöngyök célmintaspecifikusan kezelhetőek, így a médium (vér, vizelet, nyál) és a célminta egymáshoz viszonyított fizikai paraméterei nem befolyásolják a módszer hatékonyságát oly mértékben, mint a dielektroforetikus szeparálásban.

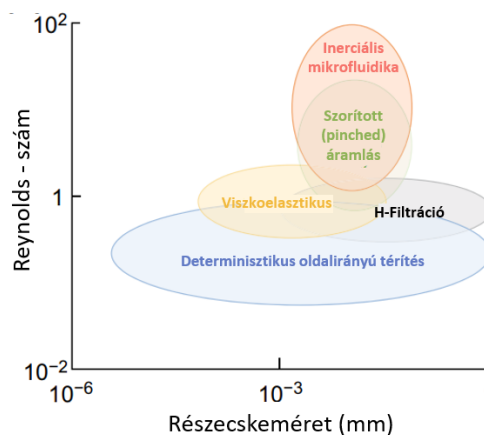
A saját méréseim során elsősorban geometriai megfontolások mentén adtam javaslatot a mágneses csapdázás hatékonyságának növelésére a gyakorlati alkalmazást is figyelembe véve. A 77 Elektronika Kft-nél zajló Lab-on-a-chip fejlesztések során olyan kérdéskörökre is ki kellett térni, mint az E. coli kötését befolyásoló tényezők, illetve a mágneses gyöngyméret szerepe.

Aktív szeparálás	Módszer alapja	Előny	Hátrány	Háttér	Alkalmazás
Elektroforézis (Variációk: CE: chip elektroforézis GE: gélelektroforézis DEP: dílelektroforézis FFF: field flow fraction)	polarizálhatóság és részecskeméret	precíz fókuszálás real-time kontroll, nagy felbontás	minta előkészítés, elektrolit oldatban nagy áram, Joule fűtés, buborék generálás, akaratlan elektro-ozmotikus áramlás DEP: biológiai minták nagy vezetőképessége és sérülékenysége	feszültség csökkentése, kémiai additív hozzáadása, vezető folyadék elektród alkalmazása, annak elszigetelése a főcsatornától, - gél membrán vagy szilárd elektromos szigetelő alkalmazása	nukleinsavak, fehérjék, baktériumok, töltéssel rendelkező molekulákra koncentrációja, szeparációja
Akusztóforézis	akusztikus sugárzási erő, az akusztikus sebességmező által keltett húzóerő, összenyomhatóság-, deformálhatóság-, részecskeméret függő;	jelölés mentes, kontaktus mentes módszer, sejtek fiziológiás oldatban hígítás nélkül fókuszálhatóak	limit az akusztikus hullámok csillapodása	akusztikus sugárzási erő, az akusztikus folyam sebességmezői által keltett húzóerő	részecskeszeparálás, sejt manipuláció, csepp szeparálás, sűrűség függő szeparálás vérben, nyers tejben, tumor sejteken, penészen, E. coli baktérium
Magnetoforézis (MAP)	felületkezelt mágneses gyöngyhöz kötött célminta csapdázása	nagyobb mintatér fogat is vizsgálható, jó szelektivitás és szeparációs hatás	mintaelőkészítést igényel, mágneses gyöngyök célminta specifikus kezelése	mágneses mező gradiens hatására a sejt-részecske komplexek térül és csapdázódik	sejtmanipuláció mozgató, rendezés, szeparálás, környezetváltozásban sejt vizsgálata, szepszis okozó baktériumok szegregálása vérből
Optikai manipuláció	noninvazív módszer, sejtire ható pikonewton nagyságú, deformálódás mértéke csupán nanométeres, méretfüggő	információ gyűjtés DNA- fehérje interakciókról, fluoreszcens módszerekkel kombinálható, diffúzió, asszociációs/disszociációs és irányított mozgások közvetlen monitorozása	kis áteresztőképességű rendszerben, kis populációban előforduló sejtekre alkalmazható, sejtek egyesével manipulálhatóak, sejt károsodhat, szkennelési, mozgatható csapdák sebesség < néhány tíz $\mu\text{m/s}$	nagy foton fluxussal rendelkező forrás (lézer, $>250 \text{ pN}/\mu\text{m}$, $>1 \text{ W}$) momentum transzfer kihasználása, alkalmazott erő nagysága szűk fókuszú lézernyalábbal, $> 100 \text{ pN}$ csapdázott gyöngyre [51] átlátszó objektum manipulálása más törésmutatóval rendelkező médiumban közel infravörös 800-1200 nm)	komplex biokémiai reakciók vizsgálata egyedi molekula szintjén, szerkezeti átrendeződés (DNS), kinematikus és mechanokémiai folyamatok vizsgálata fehérje átrendeződés, adszorpciós vizsgálatok csapdázott célmintán; sejtmanipuláció mozgató, rendezés, szeparálás, környezetváltozásban sejt vizsgálata
Termoforetikus szeparálás	méretfüggő	kontaktus mentes módszer	kis áteresztőképesség, strukturális változás fennállásának veszélye	termoforézis hatására a részecskék méretük függvényében a nagyobb hőmérsékletű helyről az alacsonyabb felé mozdulnak	polisztirol gyöngyök

2. táblázat Mikrofluidikai rendszerben is alkalmazható aktív szeparációs eljárások összehasonlítása

4.5 Passzív szegregációs módszerek és kihívásaik

A hagyományos sejtszeparációs módszerek közül elterjedtek a fluoreszcencia aktivált (FACS), vagy a mágneses-aktivált (MACS) sejtszeparálás módszerek, melyben külső (fluoreszcens-, vagy mágnes konjugált antitestes) jelölés alapján történik a sejtek válogatása. A szeparáció történhet a célminta valamely belső tulajdonsága (például sűrűség) alapján is, mint centrifugális módszer esetén. A hagyományos klinikai diagnosztikában és a biokémiai kutatásokban elterjedt célminta szeparálási, izolálási és detektálási módszerek – mint a centrifugálás, az áramlásos citometria, vagy a gél elektroforézis – esetén a mikrofluidikai megoldások csekély reagens és minta felhasználása mellett elsősorban gyorsabb és mobilisabb alternatívát kínálnak. A fentebb bemutatott aktív szeparálási módszerekhez képest a passzív szerkezetek előnye lehet az egyszerűbb összeállítás, melyeknél elsősorban a folyadékban fellépő hidrodinamikai, viszkózus erőkre vagy egyéb specifikus célminta-médium tulajdonságokra optimalizált, céltudatosan tervezett geometria ad megoldást. A passzív módszerek közül a hidrodinamikai szűrés, a determinisztikus oldalirányú térítés (DLD), az inerciális mikrofluidikai szeparálás és a viszkoelasztikus szeparálás a legelterjedtebb. Ebben a fejezetben a keresztáramlásos szűrés, a DLD, illetve az inerciális erőkön alapuló laterális fókuszálás témaköreit mutatom be. Ahogy az alábbi összefoglaló 14. ábrán is látható, a passzív módszerek közül a DLD-vel érhető el a legnagyobb felbontású szűrés az alacsony Reynolds számmal jellemezhető ($Re \ll 1$), lamináris áramlási viszonyok mellett: a módszerrel akár 20 nm-es [52] részecskeméretig (pl. exoszómák esetén) is végezhető szeparálás. Az inerciális mikrofluidikai rendszerek, melyeket a laterális fókuszálásnál is alkalmazunk, kicsit magasabb Reynolds szám tartományban működnek, és a felbontása sem olyan kiemelkedő, mint a DLD módszernél – de a sejtekre jellemző méretek megcélózhatók vele.



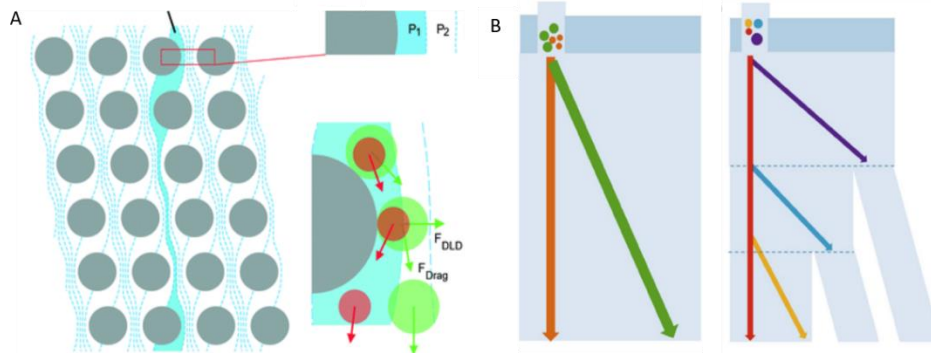
14. ábra: A passzív elválasztási módszerek működési tartományai [53]

4.5.1 Determinisztikus oldalirányú térítés alapja, és alkalmazása

A DLD módszer egy passzív, jelölésmentes módszer a sejtek méret szerinti szétválasztására, szegregációjára, vagy célminta populációk dúsítására. A módszer közel 19 éve létezik a tudományos köztudatban, melynek alapjait Huang et al. fektette le 2004-ben [54]. A fluidikai rendszer alapját egy oszloprendszer képezi, amelyben a pillérek egymáshoz képest periodikusan, egy meghatározott

szögben vannak elcsúsztatva, mely egy definiált szélességű áramlási nyomvonalat hoz létre két oszlop között (15. ábra A).

A módszer nagy átteresztőképessége miatt népszerű, mikro- és nanoméretű részecskék szétválasztásra, így daganatsejtek, véralkotók, baktériumok, nukleinsavak elkülönítésére is. Az oszloprendszer tervezése során a periodicitás mértéke és az oszloptávolság nagysága határozza meg a kritikus részecskeátmérőt (D_c). Attól függően, hogy a célrészecske mérete kisebb ($<D_c$) vagy nagyobb ($>D_c$) a kritikus értéknél, két jellegzetes mozgásformát mutathat áramlásban: cikk-cakk mozgással viszonylag egyenes vonalban áthalad az oszlopcsarnokon, vagy ütköző („bumping”) mozgást végez, mely során mérete alapján szomszédos áramlási nyomvonalakra sorol át, és eltérül a fluidikai csatorna valamely széle felé. Az oszlopok elrendezési stratégiái közül a paralelogramma típusú elrendezés a legelterjedtebb, melyet kísérleteim során is alkalmaztam, de létezik még forgatott-négyzetes oszlop elrendezés, vagy az utóbbi években megjelent hatszögletű elrendezés is [55]. Tervezés tekintetében elterjedt stratégiák (15. ábra B) lehetnek: szegregálás egyetlen vagy többszörös kritikus átmérő, mint levágási paraméter alapján. Többszörös átmérő szerint történő szeparáció előnye, hogy megakadályozza a csatornák eltömődését az egyes szakaszokban, egyre csökkenő kritikus átmérő kialakításával, amely az oszloptömb különböző régióinak változó paraméterezéséből adódik. Elrendezés és funkció alapján elkülöníthető kondenzáló-, szortírozó-, ’chirped’ tömb- melynél a résméret azonos, de több soroltolás létezik egy tömbön belül a több méretű részecskék elkülönítésére; vagy kaszkádtömb kialakítás, melynél a résméret, soroltolás is változik, regionálisan egy -egy kivezetéssel az adott részecskeméretre [53].



15. ábra: A) A determinisztikus oldal irányú térítés működési elve [56], és B) a szeparálási stratégiák szerint néhány elrendezés: egyetlen vagy többszörös kritikus átmérő szerinti megtervezett oszloprendszer (B.) [53]

4.5.1.1 A DLD szeparáció elméleti hátttere, a geometria hatásai

A DLD technológia első felbukkanásakor empirikus modellel igyekeztek definiálni az a kritikus átmérőt, mely leírja egy gyöngyméret mozgását az adott oszloprendszerben. A kutatólaborok az évek során numerikus szimulációkkal törekedtek D_c érték paraméterfüggését meghatározni.

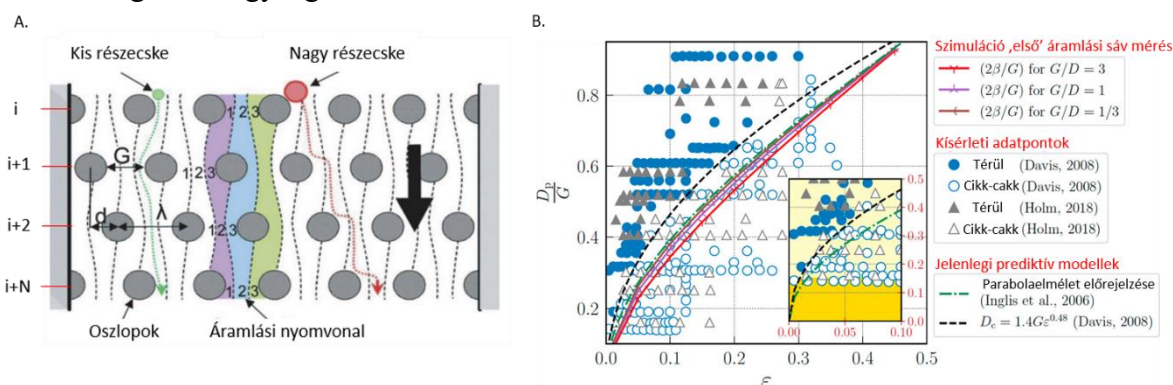
A legelső modellben az oszlop - oszlop távolság és a soroltolás mértéke volt a mérvadó, Ingis [57] teoretikus modelljében már a soroltolás törtjével, és a részecskeméret oszlopok közti távolság viszonyított arányával írta le a D_c értékét. Davis modellje [58] kísérleti adatai is jó közelítést adtak Ingis modelljével:

$$D_c = 1.4 * G\varepsilon^{0.48} \quad (13)$$

ahol elsősorban két fő geometriai paraméter (1) az oszlopok közötti távolság (G) és (2) a tömbperiódus ($N=1/\varepsilon$) meghatároz egy adott kritikus hidrodinamikai átmérőt (D_c) az oszloprendszerben. Ezek a modellek elsősorban kör alakú oszlopokra lettek fejlesztve empirikus módon. Azt, hogy az oszlopalak miként befolyásolja D_c értékét numerikus módszerekkel igyekeztek alátámasztani a Davis modell tovább fejlesztésével. Wei et al. [59] alcsatornák szélességének arányát vezette be újabb faktorként, Zhang et al. [60] inkább két geometriai tényezővel, dimenzió nélküli paramétert (α, β) vezetett be, amelyet az oszlopalak és az oszlopok elrendezése határoz meg, ezzel pontosabb leírást adva a kritikus átmérőről olyan esetekben is, mikor az oszlopalak eltérő a hagyományos kör formától.

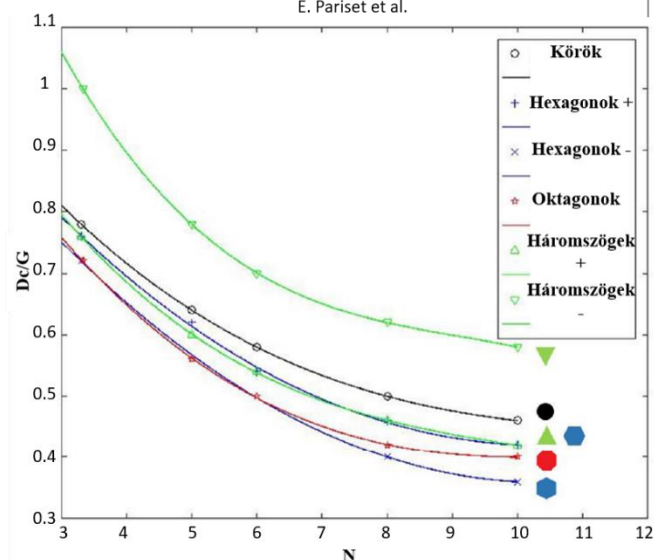
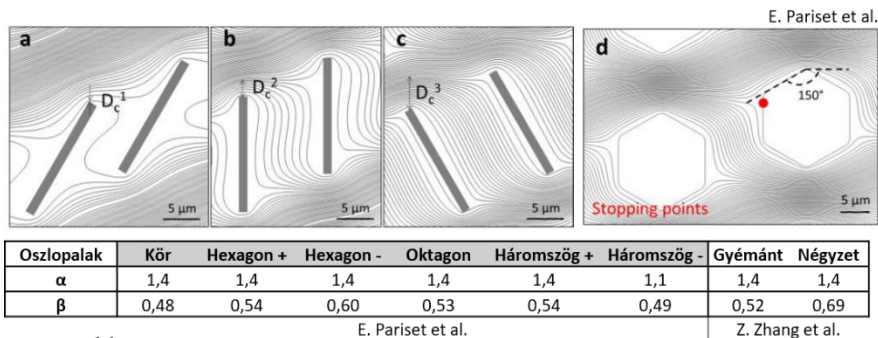
$$D_c = \alpha * G\varepsilon^\beta \quad (14)$$

ahol G a két oszlop közötti rész mérete, ε a tömbeltolás törtje ($\varepsilon=d/\lambda=1/N$), melyet a tömbperiódus reciprokaként adható meg (16. ábra A), α határozza meg az oszlop élének tájolását, β az oszlop él meredekségének nagyságát.



16. ábra: A) DLD felépítése [61] és B) a ma használt modellek összegzése. D_c érték leírására több megközelítés merült fel az évek során (1) empirikus modell (fekete szaggatott vonallal) a legjobb illeszkedést adja a D_c (cut off) érték meghatározására. (2) folyadékszimulációs modell (folytonos vonalak) - az oszloprendszer első áramlási sáv szélessége alapján (2 B) meghatározott cut off érték már valamivel pontosabb. A szimulációs és analitikai előrejelzések jól egyeznek ($2\beta = f(\varepsilon, G)$, zöld pontos vonal), bár elmondható, hogy pusztán folyadékszimulációs modellekkel nem magyarázhatóak a kísérleti eredmények során megfigyelt D_c értékek. [62]

E. Pariset et al. kutatása során [63] végelem modellezéssel világítottak rá az oszlopalak és az orientáció jelentőségére (17. ábra), és megállapították, hogy a periodicitás (N) és az oszlopméret aránya, valamint az oszlopok orientációja jelentősen befolyásolja az áramvonalak eltérülésének szögét, ezáltal a D_c érték alakulását. Azonos oszlopméret mellett ($15 \mu\text{m}$ karakterisztikus oszlopméret, $10 \mu\text{m}$ oszloptávolság) a legnagyobb D_c a lefelé mutató háromszög alapú oszlopok esetén alakul ki. Kis N értéknél a hatszög, a nyolcszög és a felfelé mutató háromszög alapú oszlopok hasonló D_c értéket eredményeznek, de növelve a periodicitás értékét a nyolcszögletű oszlopalak mutatja a legkisebb a D_c értéket.



17. ábra: Áramvonalak eloszlásának összehasonlítása az oszlopok körül megkülönböztetve három eltérő orientációt (a -c) és a hexagonális oszlopokat, ahol $N=3,3$. A táblázat összefoglalja a geometriai paramétereket és diagrammon szemlélteti a D_c értékeket különböző oszlopalknál és orientációknál. [63] [60]

Brian M. Dincau et al. [64] méréseiben bizonyította, hogy egy adott oszloprendszer által definiált kritikus átmérő (D_c) dinamikusan változhat az áramlási sebességek emelésével. 10-15 μm átmérőjű gyöngyök területét tesztelték nagy Reynolds-számok esetén ($10 < \text{Re} < 60$) mind numerikusan, mind kísérleti módon. Azt tapasztalták, hogy magasabb áramlási sebességeknél a keletkező örvények, és az áramlási nyomvonalak zavara által az oszlopok effektív hidrodinamikai mérete is nőhet, ennek eredményeként olyan részecskék is területét mutatnak, melyek kis Reynolds számú régióban, alacsonyabb áramlási sebességek esetén nem. Ezt a jelenséget Huang et al. [54] is megfigyelte 40 és 400 $\mu\text{m/s}$ áramlási sebességek implementálásánál, alacsonyabb áramlási sebesség esetén az egyes gyöngyméreteket ($\varnothing=0,4-1 \mu\text{m}$) kisebb migrációs szögben vándoroltak.

Az oszloprendszer szélességének helyes paraméterezése sem elhanyagolható. A szeparációs folyamat során a két ismertebb mozgásformán túl jelentkezhet egy harmadik, „átmeneti állapot”, melyben az elvárások ellenére nem térülnek a részecskék. A falhatás jelentősen rontja a szeparálási hatásfokot, így célszerű növelni a periódus értéket (N), valamint a csatorna keresztmetszetben megtalálható oszlopok számát (N_c), mellyel minimalizálható az átmeneti állapot jelensége [65].

Az in silico kísérletek jó irányt adnak a D_c kritikus átmérő meghatározásához, de ez a megközelítés nem elégséges: az aszimmetrikus oszlopok által generált áramlási vonalak anizotrópiáját-, a csatorna falánál kialakuló peremfeltételeket, illetve a részecskék egyéb tulajdonságait is figyelembe kell venni.

4.5.1.2 Biológiai minták szeparációja DLD módszerrel

Kihívások közé tartozik a nem gömb alakú, vagy deformálódó alakos elemek szegregálása (baktérium, vörösvértest, fehérvértest stb.), melyek áramlásban folyamatosan változtathatják alakjukat és mozgásformájukat az oszlopok közelébe érve.

Az elválasztás hatékonyságának növelését segíti a fluidikai csatorna célminta-specifikus magasság, és oszlopköz méret beállítása, megjegyezve, hogy a kisebb csatorna dimenziók növelik az eldugulás veszélyét és csökkentik a módszer áteresztőképességét. Éppen ezért egy alternatív megoldás lehet az oszlopalak változtatása, amellyel nemcsak a kritikus átmérő (D_c) csökkenthető azonos oszlopméreteket mellett, hanem a szeparálni kívánt biológiai részecskék eltérő alakja, orientációja, az áramlásban felvett mozgásformája is figyelembe vehető, vagy befolyásolható.

Timm Krüger et al. [17] a sejtek deformációs paramétereit és azok szeparációs folyamatra gyakorolt hatását is vizsgálta. Stokes áramlásban a viszkózus erők okozzák a sejtdeformációt. A deformáció mértékének jellemzésére bevezethető egy kapilláris szám (Ca),

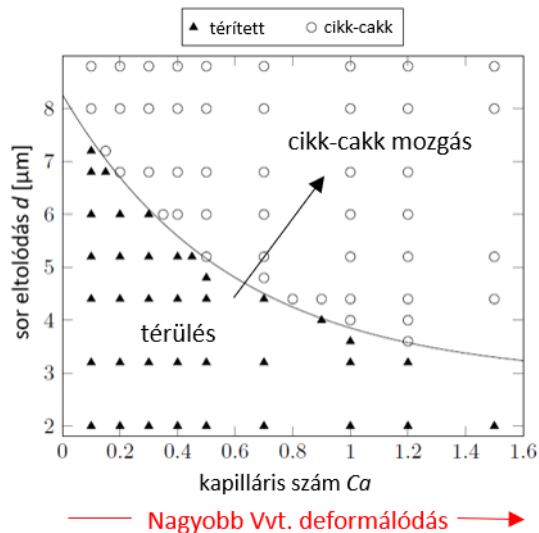
$$Ca = \frac{p \times l \times r}{K_s} \quad (15)$$

, ahol p – az alkalmazott nyomás gradiens; l – rés-hossz skála ($l = \sqrt{G \times H}$ (12); G az oszlopközi távolság; H a csatorna magasság); r – vörösvértest síkbeli sugara és K_s - a vörösvértest síkbeli nyírási rugalmassága. A deformáció alapú szeparációt a vörösvértest esetén az alábbi egyenlettel határozták meg:

$$d \text{ (}\mu\text{m)} = 2,9 + 5,4e^{-1,72Ca} \quad (16)$$

Az oszlopcsoport eltolás ($d = 2 - 8,8 \mu\text{m}$) és kapilláris szám ($0,1 - 1,5$; $0,033 - 0,49 \text{ mm/s}$ áramlási sebesség) összefüggésében a vizsgált vörösvértestek pályavonalai jellegzetesen elkülönülnek, ahogy az a 18. ábrán látható. Az oszlopgeometria és az áramlási sebességtől függő kapilláris szám együttesen befolyásolja a szeparálás hatékonyságát. Az áramlásban kialakuló áramlási nyomvonal szélesség és a sejt méret viszonya határozza meg a részecske pályáját: a Ca érték és a soretolás növelésével a cikk-cakk, vagyis a kvázi egyenes vonalú haladás válik dominánssá. Az oszloppal érintkező részecskék áthaladás során nagy viszkózus stressznek van kitéve, mely annak méretbeli kiterjedését és rotációs mozgását is befolyásolja. Az elválasztás sikere az adott deformálódó részecske két oszlop között felvett maximális laterális kiterjedésétől függ.

A módszer alkalmas rigidebb, maláriával fertőzött ($Ca = 0,4$), illetve deformálhatóbb, egészséges ($Ca = 1,2$) vörösvértestek szeparálására megfelelő oszlopméret és soretolás ($4 \mu\text{m}$, $5,5 \mu\text{m}$) mellett. Kerwin Kwek Zeming et al. [66] különleges, I oszlop alakot (vastagság: $2 \mu\text{m}$, átmérő: $8 \mu\text{m}$) javasolt vörösvértestek szétválasztására, figyelembe véve jelentős, $3,5 \mu\text{m}$ körül meghatározott rotációs méreteik alapján, amely az áramlási sebesség drasztikus növelésével sem változott jelentősen. Ez a módszer bevált a pálcika alakú (szélesség: $0,5 \mu\text{m}$; hossz: $2 \mu\text{m}$) *Escherichia coli* baktériumok elkülönítésére is – $1,12 \mu\text{m}$ kritikus átmérő beállításával. [67]



18. ábra: Részecskék mozgási karakterisztikája DLD rendszerben a soreltolás és a kapillaris szám [17]

Loutherback et al. [68] háromszög alakú oszlopokat használt a körök helyett, hogy csökkentsék a DLD szerkezetük kritikus átmérőjét áramlási aszimmetria gerjesztésével. A módosítás csökkentette a nyomásigényt és az eltömődés veszélyét, lehetővé téve nagyobb oszloptávolságok bevezetését azonos kritikus átmérő és oszlopeltolási szög mellett. Más oszlopformák is megjelentek, amelyek célja a nem gömb alakú részecskék forgási és billenő mozgásának pontosabb kontrollja, mint például a különböző tájolású T és L alakzatok. [69] A hagyományos oszlop alakok helyett Mohamed Al-Fandi et al. [70] bevezetett egy előnyösebb szárnyprofil keresztmetszetet, amely – a kör és rombusz oszlop alakokhoz képest – csökkentette a sebességgradiens drasztikus mértékét az oszlopok közötti résekben, lehetővé tette a lágy tripanoszóma sejteket (rúd alakú, effektív átmérőjük 3,7 - 4,4 μm) tangenciális erők hatására kialakuló deformációjának csökkentését.

A DLD szegregációs módszer a mikron alatti mérettartományban is működik, akár 20 nm-es méretig, azonban ekkor már a csatornaellenállás miatt alacsony elválasztási teljesítmény mellett (0,1 – 0,2 nL/perc). Benjamin H. Wunsch et al. [71] 10^2 - 10^4 bázispárból választotta el a dsDNS-t 200 bp méretfelbontással. Oskar E. Ström et al. [72] 48,5 kbp (λ fág) és 166 kbp (T4 fág) hosszú DNS-ek nagy hatékonyságú szétválasztását végezte el, 760 ng/h áteresztőképességgel. Az intermolekuláris kölcsönhatásokat, a polimer rotációt és a viszkoelasztikus erőket szintén megemlíthetjük az áteresztőképességet korlátozó tényezőkként nagy koncentrációk és áramlási sebességek esetén. Julius Marhenke et al. [73] 0,45 és 0,97 μm átmérőjű részecskék 99%-os hatékonyságú szétválasztását oldotta meg 0,5 μl /perc áramlási sebesség mellett.

A módszert genomi DNS szeparálásához is használták, bár komoly kihívást jelent a DNS alakjának változása, megnyúlása nagy nyírófeszültségek esetén. Yu Chen et al. [74] bebizonyították, hogy kisméretű rugalmas molekulákat, mint a polietilén glikolt (PEG) 5-10%-os koncentrációban alkalmazva, mérsékelt áramlási sebesség ($v_{x,max} \leq 40 \mu\text{m/s}$), a PEG jelentlétéből adódó deplációs erők miatt és az ebből adódó maximális nyírósebesség mellett ($4v_{x,max} / G, \sim 100 \text{ s}^{-1}$) a DNS elsősorban szilárd globuláris konformációt vesz fel, a vízben tapasztalt megnyúlt konformációhoz

képest – így a DLD résméretét ($G = 1,7 \mu\text{m}$) megfelelően megválasztva szegregálhatóvá válik az oszloprendszerben.

A passzív DLD módszeren túl, az utóbbi években több aktív szeparálási módszerrel kombinált, azaz erő-vezérelt DLD (f-DLD) jelent meg az irodalomban, melyekkel akár a pumpa használata, akár a szigorú strukturális kialakítás is mellőzhető. Ezek a módszerek elősegítik a dugulásmentes szeparálást, növelve annak hatékonyságát, illetve a kisebb mérettartományban történő szegregálást. Ide sorolható az elektromos térerő alapú szeparálás [75], a centrifugális erőn alapuló megoldás (c-DLD) [76], a gravitáció kihasználása (g-DLD) [77], vagy a mágneses erőterrel segített szeparálás (m-DLD) is. [78] Ezeknél a módszereknél meglehetősen nagy gyöngyméreteket alkalmaztak néhány tíz mikron átmérőtől egészen a mm átmérőig, azonban Victor Calero et al. [75] olyan elektromos mezővel kombinált szeparálást hajtottak végre, ahol annak ellenére, hogy a DLD geometriájának megfelelően a kritikus átmérő (D_c) 5-6,3 μm -nem adódik, 100, 200, 500 nm-es, illetve 1,3 μm negatív töltésű karboxilát gyöngyök elválasztása is sikeres volt. Módszerük alapján 50 $\mu\text{m/s}$ áramlási sebesség és -0,25 V (DC) + 320 V_{pp} (AC 500 Hz) feszültség mellett jelentős szegregálást értek el nanométeres skálán.

A DLD módszer a gyakorlati alkalmazás során is kiválasztásra került hiszen a passzív szeparálási módszerek közül ez alkalmazható a legszélesebb mérettartományban (nm- μm -mm) [53], exoszómától kezdve (30-100 nm), baktériumok, paraziták, véralkotók és tumorsejtek esetén is, kifejezetten alacsony Reynolds számok mellett, egészen 20 nm-es szeparációs limitig. Jelölésmentes módszerként a minta sértetlensége is biztosított. Pusztán inerciális erőkön alapszik, különböző méretű részecske szubpopulációk szegregálhatóak az oszloprendszer eltolási meredekségének beállításával. Az oszlopalak megválasztásával a célmolekula mozgásformája hangolható, így annak valamely előnyösebb paramétere alapján javítható a szeparáció. Kombinálható más aktív szeparációs módszerekkel (dielektroforézis, akusztóforézis, stb.). Kis és nagyobb Reynolds-számok ($Re \ 2 - 34$ és $40 - 400 \mu\text{m/s}$ áramlási sebesség) esetén is alkalmazható, mely utóbbinál kialakuló örvények javíthatják is a szeparáció hatékonyságát [79]. Az oszlopalak és a megfelelő oszlopköz megválasztásával javítható a fluidikai egység áteresztőképessége, és csökkenthető a dugulás veszélye. A módszerrel 10 ml/perces térfogatáram mellett valósították meg rákos sejtek és véralkotók elválasztását [80], de a jellemző térfogatáramok inkább 0-1 $\mu\text{l/ perc}$ között mozognak. [56]

A hátrányok közé sorolható, hogy az egyes sejtek eltérő deformálhatósága bonyolítja a szeparálást. Ha a sejt látszólagos mérete áramlási sebesség függő, viselkedése jelentősen eltérhet a sejtmodellekként használatos rigid, polisztirol gyöngyökétől. Az effektív sejt méret anizotróp alak esetén annak oszloprendszerben felvett orientációjától is függ. A nagyobb, deformálható sejtek viselkedése kiszámíthatatlan, ha méretük meghaladja a résméret felét [81]

A technológia megjelenéséhez képest meglehetősen későn kezdtek el az oszlopok keltette anizotrópia jelenségével foglalkozni, melyet Vernekar et al. [82] definiált, és melynek alapja, hogy az oszloprendszer aszimmetriájából adódóan nyomásgradiens generálódik a csatorna szélességében.

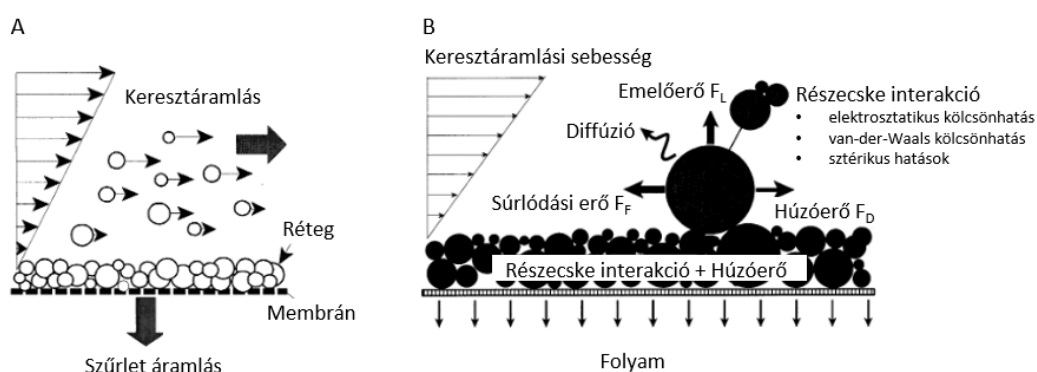
Az oszloporientáció áramlástan anizotrópiára gyakorolt hatásával kapcsolatosan még kevés tanulmány látott napvilágot. Ennek megfelelően munkám során egyrészt a választott médium (vizelet), alakos elemeinek méretéhez terveztem a geometria részméreteit, és az alkalmazott szimmetrikus és aszimmetrikus oszlopok alkalmazásával kerestem a választ arra, hogy (1.) az oszlopalak megváltoztatása miként befolyásolja a szeparálási hatásfokot, (2.) miként alakul a sebességprofil az egyes oszlopok között, és (3.) miként hat gyöngy szubpopulációk elkülönítésére.

Az irodalomban a technológia megjelenésekor alkalmazott kör alakú oszlophoz képest a későbbiekben az oszlopalak variálásával célminta specifikusabb geometriákat mutattak be. A nyírósebesség hangolásával a gömbtől eltérő morfológiájú sejtek áramlásban felvett orientációját, így az effektív méretét hangolva vált lehetővé egyes sejtek elválasztása – például vörös vértest I alakú oszlopstruktúrákkal történő szegregálása. Kutatásom során a háromszög alapú oszlopok alkalmazásával kerestem a választ arra, hogy javítható-e ezekkel a szegregálás hatékonysága. Méréseim kezdetén a DLD-t a vizelet szűrésének első fokozataként terveztem használni.

4.5.2 A keresztáramlásos szeparációs módszer alapjai és alkalmazási területei

Keresztáramlásos technológiát dinamikus, vagy érintő szűrésnek is nevezik, mely során a szűrendő folyadék párhuzamosan halad a membrán felszínrel (19. ábra) és a két oldalán kialakuló nyomáskülönbség váltja ki a viszonylag állandó szűrlet áramot. A szűrő elrendezése miatt – annak ellenére, hogy kialakul egy tömörülési réteg a membránon – a membránfelszín teljes eltömődése elkerülhető.

A szűrés hatékonyságát befolyásolja (1) a membrán külső felületének nagysága, (2) a pórusméret eloszlás, (3) a membrán porozitásának mértéke, illetve (4) a membrán szilárdsága, kémiai, valamint termikus stabilitása. Az anyagminőség, valamint a választott gyártástechnológia is befolyásolja a hatékonyságot. Mindezen paraméterek mellett kritikus (1) a keresztáramlásos szerkezetben kialakuló áramlás sebessége, (2) a transzmembrán nyomás, (3) a membrán ellenállása, (4) a szűrés során kialakult tömörülési réteg ellenállása, (5) a részecskék méretének eloszlása, (6) a részecskék alakja, (7) felületi hatása, (8) tömörülési képessége és sok egyéb effektus.



19. ábra: Keresztáramlásos szűrés sematikus ábrázolása (A) és a kialakuló kölcsönhatások (B). [83]

A keresztirányú mikroszűrés alapjait is a Darcy törvény alapján lehet megérteni:

$$J = \frac{\Delta P - \Delta \pi}{\mu * Rh} \quad (17)$$

ahol J – a permeátum fluxusa, ΔP – alkalmazott nyomás, $\Delta \pi$ – ozmotikus nyomás, μ – az oldat viszkozitása, és Rh a mikrofluidikai szűrő hidraulikai ellenállása. Amennyiben a pórusméret elég nagy ahhoz, hogy csak a kolloidok és részecskék visszatartását célozza meg, akkor a $\Delta \pi$ elhanyagolható. R_h , tekinthető a teljes hidraulikai ellenállásnak, mely összeadódva áll elő a membrán ellenállásból, és a reverzibilis és irreverzibilis ellenállásokból: $R_h = R_m + R_{rev} + R_{irrev}$.

Ahol R_m – jelöli a hidraulikus ellenállását a tiszta membránfelületnek, R_{rev} – jelöli az irreverzibilis ellenállást, mely a szűrő fizikai tisztításával (visszamosással, vagy a médium összetételének megváltoztatásával) módosítható, és végül R_{irrev} – az olyan anyag lerakódást jelöl, mely csak kémiai tisztítás során, amennyiben lehetséges, csak vegyszerekkel eltávolítható. Y. El Rayess et al. [84] vizsgálta, miként alkalmazható a keresztáramlásos szűrés a borászatban, milyen bor alkotók járulnak hozzá a szűrőfelület elszennyeződéséhez és dugulásához, és miként lehet ezeket kiküszöbölni. A szűrési eljárások során 3 mérettartományt különböztetnek meg: oldott anyagok ($\varnothing < 1\text{nm}$), például organikus savak, ionok, sók; kolloidok ($\varnothing 1\text{nm} - 1\ \mu\text{m}$), poliszacharidok, fehérjék és mások; illetve részecskék ($\varnothing > 1\ \mu\text{m}$), mikroorganizmusok, mint például az élesztőgombák, baktériumok. **A transzmembrán nyomás emelésével az irreverzibilis**

membránszennyeződések kezdenek dominálni, amelyek jelentősen befolyásolják a transzmembrán fluxust. A membrán elszennyeződése történhet a póruson belül, valamint a szűrő külső felszínén is kis részecskék, molekulák adszorpciójával, amit befolyásolhatnak a rövidtávú erők, mint a hidrofób- és dipól-dipól kölcsönhatások, illetve a hosszabb távú kölcsönhatások, mint a van der Waals erők, vagy sztérikus taszító erők.

Siegfried Ripperger et al. [83] modellje három fő befolyásoló paraméterre fókuszált, amelyek: (1) a részecskék hidrodinamikai jellemzői, (2) a diffúziós, valamint (3) a részecskék kölcsönhatásaiból adódó felületi hatások. A mikroszkópikus modellben egy adott részecskére ható erőket vizsgálva következtetni tudunk a membránon kialakuló tömörülési réteg mértékére. A membránhoz irányuló transzportot a húzóerő (F_D), valamint az emelőerő (F_L) egyensúlya határozza meg. CMF struktúrára jellemző, viszonylag állandó szűrletáram kialakulása nem azonnal alakul ki, ugyanis a kezdeti membrán ellenállásból adódó szűrési ráta csökken a felszínen tömörülő részecskeréteg vastagodása miatt. A szűrés mértéke állandósult állapotban normalizálódik, amikor a rétegvastagság már elérte az egyensúlyi konstans magasságot. Kis áramlási sebességeknél a részecskére ható húzóerő (F_d), valamint emelőerő (F_L) egyensúlyba kerül, állandósult állapotban becsülhető a fluidikai szerkezetre jellemző lehetséges legnagyobb szűrési ráta. A módszer előnye, hogy ugyan szubmikron tartományban számolni kell a diffúzióval, valamint az egyes részecske-kölcsönhatásokkal, azonban esetünkben – 1 μm feletti tartományban – jellemzően a hidrodinamikai kontrol a mérvadó [85]. Az ultraszűrési kísérletek magyarázata során a membránon való átáramlás leírására (1) a diffúziós modell, illetve (2) a kapilláris áramlási modell használható. A diffúziós modell a fordított ozmózis leírására is használt, a membrán két oldala között tapasztalható nyomás és koncentráció gradiensen alapuló ozmotikus áramlást, a kapilláris áramlási modell pedig a pórusokon keresztül zajló Hagen-Poiseuille áramlást veszi figyelembe.

A membránfelszínen kialakuló tömörülési réteg vastagságának csökkentése jelentős kihívás. A rétegződés ugyan javítható nagyobb membrán porozitás megválasztásával, vagy a felületi feszültség, a hidrofil karakterisztika hangolásával, illetve léteznek olyan mechanikai vagy kémiai módszerek is, melyekkel szűrés során tisztítható a membrán. Mechanikai tisztítási módszer meglazítja, jobb esetben eltávolítja a felszínre, pórusokba rakódó réteget, de erős részecske adhézió esetén nem hatékony. Ilyenek módszer lehet a keresztöblítés, a periodikus visszamosás, visszapulzálás, vagy akár gázbuborékok keltette turbulencia generálása az áramlásban. Kémiai tisztítás során megfelelő sav, bázis, oxidáló reagensek, felületaktív anyagok, valamint enzimek alkalmazásával bontható meg a felületen kialakult réteg. [84]

Az irodalomban fellelhető szűrési eljárások hatékonyságának összehasonlítása nehéz az eltérő pórusméretek, szűrés idő, minta összetétel és koncentráció, illetve a szűrőn kialakuló bioszennyeződés mértéke miatt. L.Vanysacker et al. [86] *Pseudomonas aeruginosa* baktérium szűrésével vizsgálták a bioszennyeződés mértékét. Méréseik során kimutatták, hogy szűrőrendszerükben 24 órán át keringetett vízhez a vizsgálandó baktériumot hozzáadva (10^8 sejt/ml) jelentős, 58 %-os csökkenés lépett fel a szűrési hozamban: $921,7 \pm 34,4$ l/m²h bar – ról, $386,7 \pm 30,54$ l/m²h bar – ra). Átlagosan $2,2 \pm 0,1 \times 10^7$ sejt/cm² kitapadást mértek 24 óra elteltével.

Baktériumok hozzáadását követően az első 5 órában csökkent exponenciálisan a szűrő permeabilitása, ezt követően lelassult a szűrő degradációja. Ennek ellenére 7 napig tudtak mérni egy lerakódást gátló ágens felhasználásával.

Xing Chen et al. [87] teljes vérminta szűrésére kétféle keresztáramlásos szűrő elrendezést alkalmazott: (1) oszlop és (2) duzzasztógát (weir) típusú elrendezést. Az előbbinél az oszlopok közötti rés; míg utóbbinál a gát teteje és a csatorna teteje közötti rés (3,5 μm magas) adja a szűrő felületét. PDMS fluidikában (160 mm csatornahossz, 10 $\mu\text{l}/\text{perc}$ áramlási sebesség, 10^4 sejt/ μl koncentráció mellett) 82,3 % -os hatásfokot értek el az oszlop típusú, és 91,2 %-es hatásfokot a gát típusú elrendezéssel a vörösvértestek elválasztása során. Az utóbbi szerkezettel megismételt szűrés után 95 %-nál is nagyobb hatékonyságot mértek.

A keresztáramlásos szűrés módszere is bekerült az alkalmazni kívánt technológiák közé az olyan előnyök miatt, mint a jelölésmentesség, vagy az inerciális erőkön alapuló szegregációs lehetőség. További előnyei, hogy elkerülhető a segédáramlás alkalmazása, a dead-end filtrációval szemben kevésbé dugulásveszélyes, kis helyigényű, nagy mintatérfogat szűrhető és más módszerekkel is sorba köthető. Jól megválasztott áramlási sebességek esetén – a nagyobb részecskékre ható felhajtó erő mértéke miatt – a szeparálási módszerre a nagyobb részecskék kisebb veszélyt jelentenek, azok csak érintőlegesen közelítik meg a filterfelszínt, míg a pórus méret alatti részecskék átszűrődnek. Ez különös előny a DLD módszerrel szemben, ugyanis ott dugulás során jelentősen módosulnak az áramlási viszonyok, a résméret felénél nem érdemes nagyobb gyöngyméretet alkalmazni, így a rendszernek van egy felső méretkorlátja.

A módszer hátrányai között azonban megemlíthető, hogy a tömörülési réteg ellenállása a leszűrt mintatérfogattal növekszik, melynek mértéke függ a réteg összennyomhatóságától [88]. Különbséget kell tenni összennyomhatatlan és összennyomható tömörülési rétegek között; a biológiai minta ez utóbbi kategóriába esik, a szűrőréteg összehúzóerővel a szűrés sebesség nemcsak csökken, de romlik a hatékonyság is. A pH változással (savak, bázisok) megszűnhet a taszító erő az egyes részecskék között, ezzel elősegítve az aggregátumok képződését, mely rontja a szűrést, előidézhet adszorpciót. A minta összetétele, az esetleges sejtlízis jelentősen befolyásolja annak fizikai tulajdonságait. A minta kismértékű változtatásával (koncentráció, összetétel, sűrűség, stb.) jelentősen változhat a szűrés hatékonysága.

Kutatómunkám során egyértelművé vált, hogy az irodalomban feltüntetett szűrők hatékonysága nehezen összevethető a filterek anyagi tulajdonságának, pórusméretének, szűrés idejének, a médium tulajdonságainak változatossága miatt. Méréseim során ezért egyszerűsített modellben vizsgáltam: (1.) pórusos szűrő elrendezés mellett a térfogatáram befolyását a rostán kialakuló tömörülési rétegre vonatkozóan, (2.) a csatornamagasság és a filtermagasság arányának befolyását a tömörülési réteg kialakulására, a szűrletben megjelenő célminta mennyiségére – kezdetben $\varnothing = 1,97 \mu\text{m}$ méretű gyöngyre, majd később E.coli-ra is. Valamint vizsgáltam (3.) az oszlopos szűrés során a nyíróerők növekedése következtében növekvő E.coli kitapadást, nyákképződést, valamint hidrofób körülmények között a rosta-rés nem megfelelő feltöltődését. Olyan duzzasztógát szerkezetű fluidikai megoldás került bevezetésre, melynél elsősorban a

magassági korlátozás a szigorúbb, így a szűrőfelszínen a lokális áramlási sebesség kisebb, ennek függvényében vizsgáltam a szűrlet összetételét. Xing Chen et al. [87] cikkében leírtak figyelembevételével a kísérleteimben az oszlopos és duzzasztógát típusú szerkezeteket alkalmaztam. A szűrő-rés egységes magasságának megtartása érdekében az oszlopokat nem hagyhattam el teljesen – a PDMS alapanyag rugalmassága miatt a gát típusú szerkezetben csak alátámasztó funkciót láttak el –, de számuk jelentős csökkentése lehet a kulcs a fluidika megfelelő működéséhez.

4.5.3 A laterális részecskefókuszálás mikrofluidikai rendszerben

A laterális fókuszálás egy passzív, jelölésmentes módszer, amely az „inerciális migráció” jelenségét használja ki részecske szeparálásra [89], [90], [91], fókuszálásra [92], szűrésre [93], illetve célminta dúsításra [94]. Előszeretettel alkalmazzák még a célrészecskék megfelelő pozicionálására [95], különösen áramlásos citometriás mérések esetén, ahol a mérési hibák elkerülése végett fontos, hogy a célsejtek minél nagyobb hányada érkezzon meg egyszerre a optikai kiolvasási zónába.

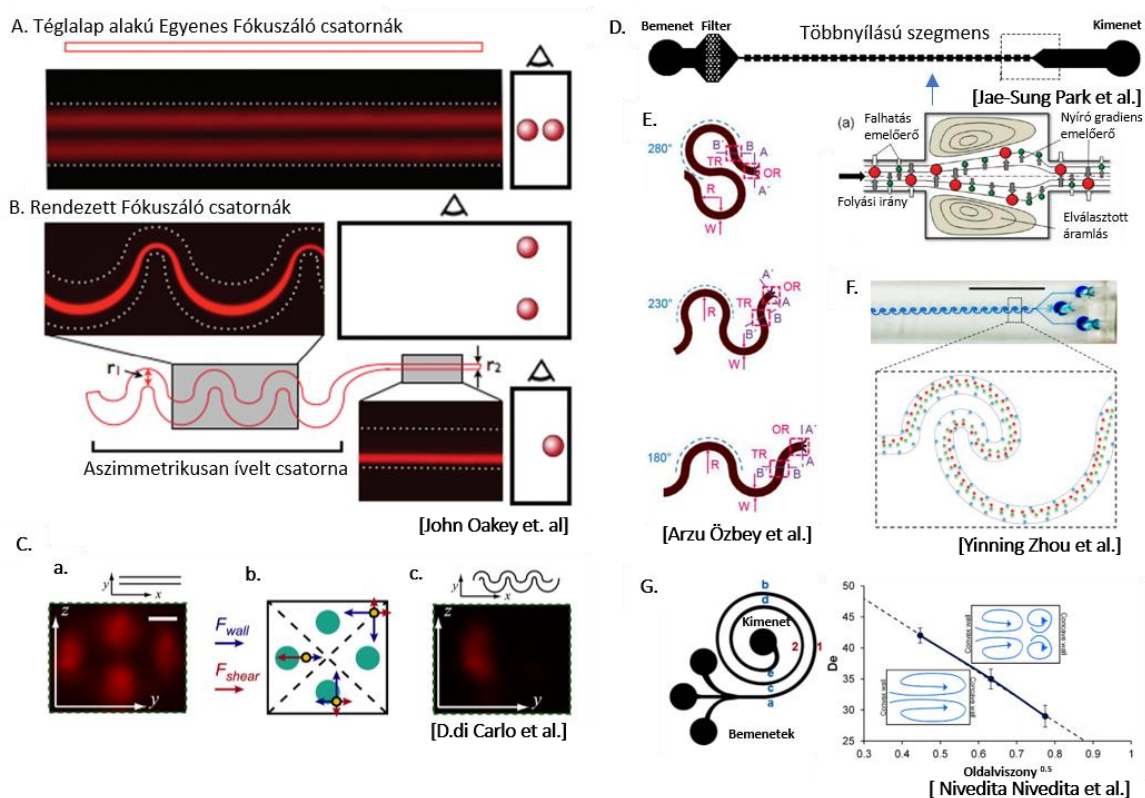
Segré et al. [96] tanulmánya alapján vált ismertté 1961-ben, melyben Poiseuille áramlásban, alacsony Reynolds számok mellett gömb alakú részecskék egyensúlyi pozíciókban rendeződését vizsgálta. Megfigyelte, hogy azok a cső sugarának 0,6 szorosánál kialakuló körgyűrűbe rendeződnek. A részecskék egyensúlyi helyzetének megtalálásában segít egyrészt nyíróerők indukálta emelőerő – mely a parabolikus áramlási profilnak köszönhetően a falak irányába tolja a részecskéket, illetve a fal hatás okozta emelőerő – mely onnan elhajtja azokat. Külső erőter alkalmazása nélkül pusztán a csatorna geometria, illetve áramlási sebesség manipulálásával szegregálhatóak a célsejtek, azoknak valamely fizikai tulajdonsága, mint például sejthalak [97], méret [91], elaszticitás, deformálhatóság [98], vagy az áramlásban felvett mozgásformák alapján. A módszert leginkább az élelmiszeriparban és az orvosdiagnosztikában alkalmazzák, mikronos-, szubmikronos [89] tartományokban, de előfordul néhány nanométeres méretbeli [99] eltéréssel rendelkező populációkban is. Ilyen feladat lehet a ritka – tumor – sejtek izolálása [94], sarjadzó élesztőgombák populációinak méret szerinti szegregálására [100], baktériumok elkülönítése vérből [93] [101], vizeletből, és más médiumokból.

A rigid polisztirol gyöngyök kiváló sejtmodellként szolgálhatnak, vizsgálható az adott geometriában méretük alapján felvett laterális pozíciójuk, azonban a biológiai minták esetében több hatás is bonyolítja a folyamatot, mint például a sejtek változatos morfológiája, deformálhatósága, a viszkozitási kontraszt a tápközeg és a sejtbelső között, illetve a kialakuló sejt-sejt kölcsönhatások. Ezenkívül egy organoid jellegzetes mozgását képesek még befolyásolni a környezeti hatások és a kísérlet jellemző körülményei, mint az alkalmazott minta sűrűsége, összetétele.

Az évek során a jelenséget számos eltérő csatorna-keresztmetszet esetén tanulmányozták, az egyensúlyi pozíciók számának és elhelyezkedésének függvényében (négyzet [102], téglalap [103], trapéz [104], háromszög, félkör [105]). Többféle olyan csatorna-geometria is létezik, mely a Dean-örvények kialakulását is kihasználva, a részecske méretétől függő fókuszálást vagy szeparálást valósít meg. Ilyen például a változatos kanyarulat csatornák, legyenek azok akár szimmetrikus [106], aszimmetrikus [107] [108], vagy spirális alakúak [95], illetve periodikus csatorna szűkületekkel [109] [110] tüzdelt fluidikai rendszerek.

Az alkalmazott médium jellege szerint különbséget kell tenni Newtoni, illetve nem-Newtoni folyadékok között. Jelentős eltérés, hogy míg a Newtoni folyadékok esetében a viszkozitást állandónak tekintjük, vagyis a sebességgradiens emelésével a nyírófeszültség egyenes arányban változik, addig a nem-Newtoni folyadékok esetében – mint például a vér [111], a nagy molekulású oligoszacharidokat, mucint tartalmazó nyál [112], vagy a nagy konformáció változásra képes nukleotid, DNS oldatok [113] – nem áll fent ez az arány, azaz a

sebességgradienssel, a nyírófeszítéssel, a hőmérséklet módosulásával is változik a viszkozitás. Laterális fókuszálás viszkoelasztikus folyadékok – például poli(etilén-oxid) (PEO) oldatok – alkalmazása mellett is megvalósítható, kihasználva a konzervatívabban változó sebességprofil, és az alacsonyabb nyírófeszítéseket; ahol a tehetetlenségi erőkön túl a rugalmas és viszkózus erők hangolják a sejt pozíciókat.



20. ábra: Inerciális fókuszálás stratégiai megfontolásai (A-B.). Csatorna geometria megválasztása segéd folyadék nélkül: egyenes csatornában 4-ről 2 fókuszálási-, hullámcsatornában 1 pontra csökkenthető (C.). A periodikus szűkületekben (D.) kialakuló örvények (D. (a)) segítik a fókuszálást, vagy a hullámcsatorna elemeinek görbületével történik a pozíció hangolása (E-F.), mely spirál formát is felvehet (G.).

Newtoni folyadékok esetén négyzet keresztmetszetű egyenes csatornában négy (20. ábrán/C.a), téglalap keresztmetszet esetén pedig két egyensúlyi pozíció figyelhető meg [114], ahogy ez a 20. ábrán/A. látható. Ebben az esetben a hosszabb oldalfalak közepén vándorolnak a részecskék, azonban az áramlási sebességek drasztikus emelésével sem tudták tovább csökkenteni a fókuszálási pozíciók számát. További fókuszálás a csatorna geometria kanyarulatossal kialakításával érhető el (20. ábrán/B.): Dino di Carlo [92] egy aszimmetrikusan kanyarulatossal csatornában szemléltette a folyadék tehetetlensége miatt generált Dean-örvények részecskékre gyakorolt pozícionáló hatását. Csatorna keresztmetszetben két ellentétesen forgó örvény jön létre, ezek húzóereje hat a részecskék laterális fókuszálódásának egyensúlyi pozíciójára – így már lehetővé válik a laterális fókuszálás egyetlen pontban (20. ábrán/ C.c).

Jinghong Su et al. [115] részletekbe menően tanulmányozta a részecske migrációt, illetve egyensúlyi pozíciók kialakulásának helyeit gömb, illetve nem-gömb alakú részecskék alkalmazásával, téglalap keresztmetszetű csatornában. Ez a problémakör komoly jelentőséggel bír, ugyanis a részecskére ható nyíróerő jelentősen befolyásolja annak csatornában felvett mozgásformáját. Egy fánk alakú vörösvértest például felvehet pörgő mozgást, megnyúlhat,

zsugorodhat [116], de extrém esetekben még ejtőernyőre hasonlító formát [117] is ölthet. Egy pálcika alakú *E. coli* baktérium a hossz és keresztmetszet méretei alapján előszeretettel vesz fel oszcillációs mozgást az áramlásban, ellentétben egy gömb alakú *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgombával, vagy a kísérletek kezdeti fázisban modellezésre használt fluoreszcens polisztirol gyöngyökkel. A részecskék méretbeli csökkenése, a módszer mikrométer alatti tartományban való alkalmazása is nehézséget okoz, bár Lei Wang et al. [118] bizonyította, hogy már pusztán passzív módszerrel is lehetséges 2 μm , illetve 920 nm átmérőjű részecskéket laterálisan fókuszálni folytonos áramlásban.

4.5.3.1 A laterális részecskefókuszálás elméleti háttere

Poiseuille áramlásban a fő áramlási profil parabolikus még kanyarulatot csatornában is, vagyis nagyobb lokális áramlási sebesség tapasztalható a csatorna középvonalában. Ennek megfelelően, a nyírógradiens indukálta emelőerő (F_s) eltolja a részecskéket a csatorna központjából radiális irányba. A fal közelében az aszimmetrikus sebességprofil és az ébredő nagyobb nyomás miatti falhatás indukálta emelőerő (F_w) már a csatorna közepe felé hajtja a részecskéket. Egyensúlyi pozícióban a két erő ellensúlyozza egymást. Kanyarulatot csatornában a tehetetlenségi emelőerőkön túl (F_z), a csatorna geometriájából adódó másodlagos keresztirányú áramlás – Dean áramlás – is megjelenik, vagyis két egymással ellentétesen forgó örvény alakul ki a csatorna keresztmetszetében, és a rotációs áramlás, valamint az általuk keltett húzóerő (Dean drag force: F_d) meggyorsítja a részecskék migrációját az egyensúlyi pozíciójukba. A fókuszálás leírásában legfontosabb viszonyszámokat az alábbi egyenletek írják le:

- (1) a csatornára jellemző Reynolds szám (Re_c) és a részecskére vonatkozó Reynolds szám (Re_p) [119], [120]: dimenzió nélküli számok, amelyek az áramlási viszonyokat írják le a közeg belső súrlódási aránya alapján, valamint zárt csatornában jellemzik a részecskére ható erőket:

$$Re_c = \frac{u_m * D_H * \rho}{\eta} \quad (18) \quad \text{és} \quad Re_p = \frac{u_m * a^2 * \rho}{\eta * D_H} = \frac{a^2}{D_H^2} * Re_c \quad (19)$$

, ahol u_m – maximális sebesség a csatornában; D_H – hidraulikus átmérő; η – dinamikus viszkozitás; ρ – sűrűség; a – részecskeméret. A hidraulikus átmérő négyszögletes csatornában a csatorna szélesség (w) és magasság (h) alábbi viszonyaként írható fel:

$$D_H = \frac{2 * w * h}{w + h} \quad (20)$$

- (2) az emelőerők összege (F_L), mely a „kétlépcsős” folyamatot figyelembe véve a nyírógradiens indukálta emelőerő (F_s) és a fal-indukálta emelőerő (F_w) összege, figyelem: pozíciófüggő [115]:

$$F_L = F_W + F_S = \frac{(\beta^2 * G_1 + \beta * \alpha * G_2) * \rho * u_m^2 * a^4}{h^2} \quad (21)$$

, ahol β – dimenzió nélküli nyírási sebesség; α – dimenzió nélküli nyírási gradiens; G_1, G_2 – a laterális pozíciót leíró függvények.

- (3) egyensúlyi helyzet tovább hangolható a Reynolds-szám növelésével, egy a fal közelében, vagy alacsony Reynolds-szám tartományban még kevésbé domináns erővel: a forgás által kiváltott emelőerővel (F_R), melyet a részecskealak vagy a csatorna geometria is segíthet.
- (4) a Dean szám (De) egy dimenzió nélküli szám, mely kanyarulatot csatornában jellemzi a folyadékok mozgását. A geometriából adódóan a folyadék tehetetlensége miatt másodlagos

keresztáramlás – Dean áramlás – alakul ki a csatorna keresztmetszetében. Az örvénylő áramlás sebessége és az ebből adódó húzóerő tovább hangolja a részecskék egyensúlyi pozícióit.

A Reynolds szám növelésével nő a De értéke, változik az örvények középpontjának pozíciója és száma. De értéke függ a csatorna Reynolds számától (Re_c), a hidraulikus keresztmetszettől (D_h) és a kanyarulat sugarától (R), melyek alapján az alábbi egyenlet írható fel [108]:

$$De = Re_c \sqrt{\frac{D_h}{2R}} \quad (22)$$

Dino di Carlo et al. [92] aszimmetrikus kanyarulatot csatornára vonatkozóan kifejtette, hogy míg a tehetetlenségi emelőerők mindig merőlegesek az elsődleges áramlási irányra, addig a Dean húzóerő a másodlagos áramlás irányában hat, oly módon, hogy az egyensúlyi pozíciók számát csökkenti, de önmagában fókuszálásra képtelen. Az emelőerők (F_z) és a Dean húzóerő (F_D) közötti arány az alábbi módon írható fel:

$$\frac{F_z}{F_D} \sim \frac{1}{\delta} \left(\frac{a}{D_h}\right)^3 Re_c^n \quad (n < 0) \quad (23)$$

, ahol (δ) a görbületek arányát írja le ($\delta = D_h/2r$), a a részecskeméret, (Re_c) csatorna Reynolds száma, és D_h a csatorna hidraulikus átmérője.

Di Carlo széles skálán tesztelte a paraméterek összefüggését: $Re_c = 0,075 - 225$, $a = 2 - 17 \mu\text{m}$, $D_h = 10-87 \mu\text{m}$, $De < 50$, és megfigyelte, hogy a:

- (1) Re_c növelésével dominánsan nő a Dean húzóerő, és $De > 20$ felett már a részecske keveredés a mérvadó,
- (2) meghatározott egy részecskeméret - csatorna keresztmetszet arányt mely felett a fókuszálás lehetséges:

$$\frac{a}{D_h} > 0,07 \quad (24)$$

A nem-Newtoni folyadékok esetén számolni kell a rugalmassági erőkkel, a nyírás gyengülésével, a részecskék deformálhatóságával és a részecskékölcsönhatásokkal. Egyenes csatornában is változatosabb egyensúlyi pozíciók alakulhatnak ki az áramlási keresztmetszetben, ugyanis a viszkoelasztikus hatás inkább a csatorna középpontja felé, a nem-uniform normál feszültségeloszlás pedig a sarkokba rendezik a részecskéket, így 5 fókuszpont alakul ki.

Az elaszticitás karakterizálására a Weissenberg szám (Wi) került bevezetésre, mely a polimer oldat relaxációs idejének, és a karakterisztikus nyíró arány szorzatából áll össze:

$$El = \frac{Wi}{Re} = \frac{\lambda * \mu * (w+h)}{\rho * h * w^2} \quad (25)$$

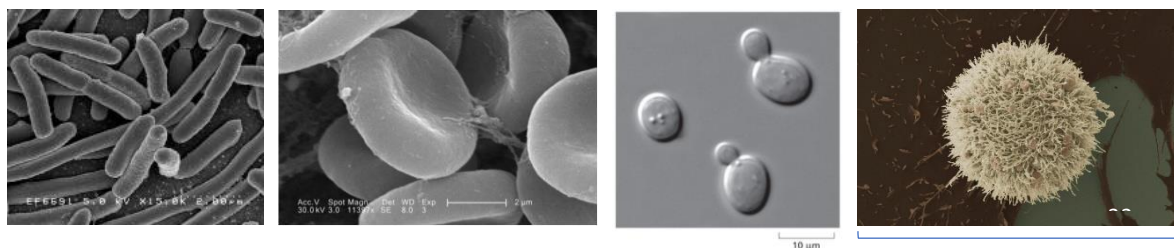
, ahol μ – viszkozitás, λ – a relaxációs idő, ρ – folyadék sűrűsége, és h – a csatorna magassága és w – a szélessége, mint a newtoni folyadékok esetén is. Seungyoung Yang [121] polietilén-oxid (PEO) oldatban vizsgálta az 5,9, illetve 2,4 μm -es gyöngyök szegregációját az elaszticitás függvényében. Egy 50 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ keresztmetszetű csatornában 0,04 ml/h áramlási sebesség mellett nem tapasztalt részecske rendeződést az alacsony elaszticitású médiumban (0,005% PEO, $El = 3,21$, $Re = 0,11$, $Wi = 0,36$). A viszkozitás megemelésével (0,05% PEO, $El = 21,51$, $Re = 0,11$, $Wi = 0,36$) előbb a viszkózus erők váltak dominánssá és kialakult az 5 pontba rendeződés, míg végül

az áramlási sebesség emelésével, az inerciális erők dominánssá válásával ($v=0,2$ ml/h, $Re=0,37$, $Wi= 8,04$) a részecskék $\pm 4\mu\text{m}$ pontossággal a csatorna középpontjában fókuszálódtak. A módszer részecske dúsításra alkalmas: míg Newtoni folyadékban nem volt tapasztalható szegregálás, addig nem-Newtoni folyadékban már $0,2$ ml/h áramlási sebességnél koncentráálódtak a nagyobb gyöngyök a csatorna közepére.

Kutatásom során elsősorban Newtoni folyadékokkal dolgoztam, abban az esetben, ahol vérminta került alkalmazásra ott egy jelentősebb hígítással kiküszöböltem az ébredő viszkoelasztikus jelenségeket.

4.5.3.2 Sejtalk jelentősége a laterális fókuszálás szempontjából

A gömb alakú polisztirol gyöngyök jól használhatóak ideális állapot szimulálására, ahol sem a sejt deformálódásának mértéke, sem annak áramlásban felvett mozgásformája nem befolyásolja az egyensúlyi pozíciók helyzetét. A tényleges kérdés, hogy az adott geometriával rendelkező rendszerünkben felvett modellgyöngy térkép mennyire felel meg a választott biológiai célminták esetének: *E. coli*, vörösvérttest, élesztőgomba: *Saccharomyces cerevisiae*, illetve *HeLa* tumorsejtvonal, melyek nemcsak méretükben, de alakjukban is eltérőek (21. ábra).



21. ábra: Különböző sejtek morfológiája: *E. coli* [122], Vörösvérttest [123], Élesztőgomba: *Saccharomyces cerevisiae* [124] és *HeLa* sejt [125] pásztázó elektronmikroszkópos felvételei

Jinghong Su et al. [115] háromdimenziós numerikus szimulációs tanulmányt mutattak be, melyben vizsgálták a sejtalkok egyensúlyi fókuszálási pozíciók helyzetére gyakorolt hatását egyenes csatornában különböző csatorna-keresztmetszet és változatos Reynolds számok (50-400) mellett. Számításaikban figyelembe vették (1) a gömbalaktól eltérő méretfaktort (L/D), (2) a részecske fő méretének csatorna magassághoz viszonyított arányát ($\kappa=L/H$), (3) a csatorna keresztmetszet méretarányát (W/H), valamint (4) az emelési tényező mértékét (C_L)

$$C_L = \frac{F_L}{\rho u_m^2 a_n^4} \quad (26)$$

(a_n – névleges átmérő, mely gömb alakú részecske átmérőjével megegyező térfogatú hengeres részecskét jelöl). A számítások során az egyensúlyi pozíció az inerciális vándorlás mértéke és az átlagos emelő koefficiens (C_L) állandósult állapotban kialakuló térbeli eloszlása alapján került meghatározásra az adott csatorna keresztmetszetben. A gömb és nem- gömb alakú gyöngyméretekre vonatkozó ekvivalens gyöngyméret meghatározása során három kategória szerint osztályoztak: (1) névleges átmérő (a_n), (2) axiális hosszátmérő (a_a) és (3) forgási átmérő (a_r). A Reynolds szám változásának függvényében adták meg az ekvivalens méretet, mely (1) $Re=50$, négyzetes és téglalap csatorna keresztmetszet esetén egyaránt az axiális hosszátmérő; (2) $Re \geq 100$, téglalap- és $Re= 200$, négyzetes keresztmetszet esetén a forgási átmérő. Az L/D arány függvényében szintén több

megfigyelést tettek. L/D növekedtével (1) a falak irányába tolódnak az egyensúlyi pozíciók, de az irány is megváltozik $L/D=3 - 4$ esetén, ($Re=150 - 200$) értékeknél; (2) az oszcilláció mértéke növekszik pálcika alakú sejtek esetén. (3) A rotációs mozgás alakul ki az extrém emelőerő koefficiens és szintén növekvő L/D érték esetén. (4) Bukdácsoló mozgás alakul ki lapos ellipszoid forma esetén növekvő Re szám, és csökkenő L/D érték esetén.

A **pálcika alakú sejtek** esetén figyelembe kell venni, hogy a baktériumok környezeti hatások függvényében – pH, viszkozitás, kémiai környezet, felületi érdesség, hőmérséklet – flagellákkal önálló mozgásra képesek [126]. Viola Tokárová et al. [127] öt különböző baktériumfaj mozgását vizsgálta eltérő méret, flagellumszerkezet mellett, különböző átmérőjű, lineáris-, és szerpentin típusú mikrocsatornában (*Vibrio natriegens*, *Magnetococcus marinus*, *Pseudomonas putida*, *Vibrio fischeri* és *Escherichia coli*). A sejtmotilitást 2D és 3D baktériumpályákkal ábrázolták, mely alapján három csoportba sorolták a baktériumokat:

	Viselkedés	Távolság	Kölcsönhatás
1.	dúsulás a fal közelében	néhány 10 nm faltól	szterikus
2.	fallal párhuzamosan mozgó	néhány μm a felülettől	hidradinamikai visszatartó erő
3.	faltól menekülő	falat elhagyó	hidrodinamikai taszító erő

3. táblázat Az egyes baktériumfajtákra jellemző viselkedés, pozíciójuk a fluidikai csatornában, és a rá ható, jellemző kölcsönhatás csoportosítása. A sejtméretaránya és a flagellum hossza nagyban hozzájárul az osztályozáshoz. [127]

Az *E. coli* baktériumot a hidrodinamikai elvek és a fajspecifikus mozgások alapján a párhuzamosan mozgókhöz sorolják, de kis hányadban a többi mozgásformákat is mutatják. Kanyarulatós csatornában (csatornamagasság: $6 \mu\text{m}$, hossz: $100 \mu\text{m}$, fogak szélei közt távolság: $5, 10, 15 \mu\text{m}$) megfigyelték, hogy a szélesebb csatornában inkább a hidrodinamika által vezérelt mozgások jelennek meg, szűkebb csatornában viszont a lokálisan domináns szterikus hatások dominálnak a flagellum és a falak között. $10 \mu\text{m}$ -os csatornában a két hatás nem működött együtt, a párhuzamosan úszó baktériumok könnyen csapdázódtak, és a karakterisztikus alak jutott nagyobb szerephez. Az *E. coli* rendelkezik a legkisebb aránnyal a sejt méret és a flagellum között, így körkörös mozgást követően csapdázódtak a kanyarulatós csatorna sarkaiban.

Az *E. coli* baktérium pálcika alakú, legkisebb mérete $0,5 \mu\text{m}$, hossza általában $2 \mu\text{m}$ körüli [67]. A szakirodalmi áttekintés alapján - a választott csatornakeresztmetszetünkben és az alkalmazott nagy áramlási sebességeknél - a sejt felszín és a csatornafal közötti szterikus kölcsönhatások jelenléte elhanyagolható, csak a hidrodinamikai hatásokat kell figyelembe venni. A GFP-módosított *E. coli*-val végzett kísérleteknél meg kell jegyezni, hogy a vad típushoz képest ezek a módosított baktériumok nem képesek flagellumot növeszteni vagy úszni.

Saját mérések során alkalmazott szerpentin típusú kanyarulatós csatornában (magasság: $25 \mu\text{m}$ szélesség: $50 \mu\text{m}$), még a hidrodinamika által vezérelt mozgásforma volt jellemző az *E. colira*.

A **korong alakú sejtekkel** kapcsolatosan Thomas M. Geislinger et al. [116] a hidrodinamikai erők részecskemozgásra gyakorolt hatását vizsgálták rigid és deformálható részecskék esetén. A vörösvértetek könnyen deformálódó, kettős lipid réteggel borított, bikonkáv

- korong alakú részecskék. Hidrodinamikai áramlásban változatos mozgásformákat mutathat, mint például: (1) bukdácsoló mozgás – alacsony nyírási sebességnél, (2) lánctalp mozgás – nagyobb nyírási sebességnél, vagy (3) lengőmozgás. A jellemző sejtmozgáshoz hozzájárul a médium és a sejt citoplazmája közti viszkozitáskülönbség, illetve a sejt felületének nagysága. A nyíróerő hatásának mértéke szerint a sejtalak akár papucs vagy ejtőernyő alakot is felvehet. Matematikai modellekkel sem egyszerű megfejteni, miként járul hozzá az inerciális emelőerőkön kívül a forgó sejteken ébredő emelőerő is a laterális fókuszáláshoz. Magasabb hematokrit szintnél a nyírósebesség emelésével csökken az effektív viszkozitás (nyírásra vékonyodó / „shear thinning”). A sejt-sejt interakció növekszik, a csatorna szigorú szűkítése (<8 μm) pedig drasztikusan megváltoztatja a sejt dinamikus alakját, illetve a sejt populáció rendeződését.

Di Carlo [92] aszimmetrikus szerpentin csatornában vizsgálta a vörösvértestek mozgását 2 % v/v hígításban. Megfigyelte, hogy nagyobb áramlás sebességek ($Re = 60$) sem befolyásolták mérvadóan sejtek életképességét, és merev részecskéként viselkedtek az áramlásban. Egy 50 μm -es oldalhosszúságú négyzet keresztmetszetű csatornában a vörösvértestek rotációs igazodását is megfigyelték, a lemez normális irányú tengelye párhuzamos rendeződött a legközelebbi falhoz. A vörösvértestek méretaránya $L/D = 4:15$ [115], a 2 μm vastagság és 7,5 μm átmérő mellett. A gömb alakú gyöngyökhöz viszonyított egyenértékű átmérője a forgással ábrázolható átmérőjű, de nagyobb κ vagy Re esetén az átmérő valamivel nagyobb is adódhat. Az emberi vérben a Reynolds szám általában alacsony $Re \leq 1$ kapillárisokban és kisebb artériákban, de elérheti a 4000-es értéket is az aortában [116]. A kialakuló nyírófeszültség szerint, alacsony Re esetén a bukdácsoló, nagyobb értékek esetén gördülő mozgás jellemző. [128] A tápközeg viszkozitásának és a sejt-sejt kölcsönhatások csökkentése érdekében, a kísérletekben felhasznált vérmintát általában hígítják.

Gömb alakú sejtek (élesztő és HeLa) morfológiáját és mozgását elemezve Eliezer Kainan et al. [100] a *Saccharomyces cereviae* inerciális fókuszálását és válogatását vizsgálta ívelt csatornában magasabb Reynolds számok mellett ($Re = 215$; 1,5 ml/perc). Célja sejtek életkorral összefüggő szeparációja volt, hiszen a bimbóképződés mértéke, vagyis a sejt méret jól jelzi az élesztő sejtek öregedését. Replikációs életkoruk meghatározható, a bennük felhalmozódó kitin gazdag rügyhegek festésével. Méretük lineáris növekedést mutat $\sim 0,8 \pm 0,1 \mu\text{m/hec}$ méretváltozással, 2 μm átmérőjű rügytől egészen 10-20 μm -os sejt méretig.

Nagy sűrűségű élesztősejt szuszpenziót vizsgálva több nap után kimutatták, hogy a populáció korösszetétele szerint a fiatalabb gombák felszínén 0 - 2 rügyheg, az idősebbeken 3 - 10 rügyheg található. Ennek megfelelően a fiatalabb élesztőgombák átmérője 2,3 – 4,7 μm között, a felnőtt élesztőgombák átmérője pedig 5,4 – 11 μm között változik. A keletkezett rügyhegeket fluoreszcensen jelölték, és a csatorna végén összegyűjtött élesztőpopulációk szórását is vizsgálták. A gyűjtést nagy áteresztőképességgel tudták elvégezni (10^7 élesztő/perc), a meglehetősen nagy nyírófeszültség (691 Pa) ellenére sejtkárosodás nélkül. A kisebb, fiatalabb sejtek esetén $\sim 12\%$ -os feldúsulást értek el. A nagyobb, kifejtett sejtek egy másik kimeneten hagyták el a csatornát $\sim 46\%$ -os dúsítással. PDMS-üveg hibrid platformokat használtak a tesztek során.

Méréseim során ugyanazokat a törzseket használtam, az élesztő sejtek átmérője körülbelül 5 és 10 μm közé esett, de a sejtek kor szerinti megoszlását figyelmen kívül hagytam, csak hidrodinamikai viselkedésüket és fókuszpozíciójukat vizsgáltam.

A laterális fókuszálás módszere is bekezdült a vizsgált technikák közé, mivel nem igényel különösebb felületkezelést, mint az egyes szűrési módszerek szűrési felszíne, meglehetően nagy Reynolds számok mellett is alkalmazható, nagy áteresztőképességgel rendelkezik, valamint az áramlási sebesség megváltozására kevésbé érzékeny, mint a DLD vagy a keresztáramlásos szűrés. A csatorna geometriájával – csatorna keresztmetszet és hossz – a gyöngyök fókuszálása, pozíciója is hangolható, könnyen miniaturizálható (spirális csatorna elrendezéssel), más fluidikai egységgel kombinálható, és a jelölésmentes módszerrel méret szerinti részecske szubpopulációk is elkülöníthetők.

Hátrányok között azonban meg kell említeni, hogy a minta sűrűsége, viszkozitása, sejt-sejt interakciók befolyásolják a szegregálás sikerességét. A kisebb sejt méretek fókuszálása nehézkes, hiszen az a csatorna keresztmetszet jelentős csökkentésével lehetséges, mely befolyásolja a fluidikai egység áteresztőképességét is. A kihívások közé sorolható, hogy a biológiai minták deformálódására az áramlási sebesség hatással van, áramlásban felvett mozgásformájuk – effektív alakjuk is befolyásolhatja azok egyensúlyi pozícióját.

Munkám során elsőként a DLD szűrési eljárást teszteltem, ahol 16,5 μm átmérőjű gyöngyöket is szegregáltam, így a laterális fókuszálás esetén már csak $\leq 16,5 \mu\text{m}$ méretű gyöngyöket alkalmaztam ($\varnothing = 0,5-16,5$) és vizsgáltam azok laterális pozícióját a fluidikai egységben. Kutatásom kiterjedt: (1.) a csatorna keresztmetszet hatásaira az adott gyöngyméreték fókuszálhatóságára; a csatorna keresztmetszet arányának különböző eseteire, illetve arra, hogy az áramlási sebesség módosítása miként hat a kialakuló Dean-örvények alakjára, ezzel a gyöngyök méret szerinti egyensúlyi pozíciójának alakulására. Elemeztem, hogy (2.) a tervezett fluidikai egységben nem szeparálódó gyöngyök miként pozícionálhatóak (áramlási sebesség, csatorna keresztmetszet, csatornahossz megváltoztatásával). Vizsgáltam (3.) optimalizált, 25 μm magas és 50 μm kritikus keresztmetszettel rendelkező csatornában a DLD és a Keresztáramlásos kísérletek térfogatáramával összevethető 0,5-1 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség mellett az egymástól megfelelő távolságban fókuszálható gyöngyméreték (4,8 és 15,8 μm) egyensúlyi pozícióit. Egy gyöngytérkép felállítására ($\varnothing = 0,5 - 16,5 \mu\text{m}$) került sor, és a megfelelő gyöngymodell összevetésre került különböző alakú (pálcika, bikonkáv, gömb, szabálytalan) és méretű biológiai mintával. (4.) Vizsgálva a gyöngymodell alkalmazhatóságát a biológiai mintára vonatkozóan megfigyeltem, hogy az alkalmazott fluidikai egységben $> 2,9 \mu\text{m}$ feletti méretekre sikeres volt a koncentráció, viszont a pálcika alakú E. coli baktériumok kisebb méretük alapján pozícionálódva, rosszabb koncentrációi értéket mutattak, mint a mimikálásukra alkalmazott 1,97 μm átmérőjű gyöngyök. Így a fluidika méreteinek megváltoztatásával E. coli koncentrációjának javítása is célként került kitűzésre.

4.6 Irodalmi összegzés

Az előző fejezetekben a mikrofluidikai tudományág és annak alapvető jelenségeinek fizikai magyarázata után bemutattam a legfontosabb aktív és passzív szeparációs és fókuszálási technikáit, különösen kiemelve a 1) magnetoforetikus elválasztást, 2) a determinisztikus oldalirányú eltérítést, 3) a keresztáramlásos szeparációs módszert és 4) a laterális fókuszálást. Mindkét elválasztási (aktív és passzív) módszernek jelentős szerep jut integrált mintapreparációs eljárások során jellemzően biológiai minták feldolgozása során orvosi diagnosztikai, gyógyszerkutatói, élelmiszerbiztonsági és vízmonitorozó rendszerekben. Számos esetben szükséges a mérendő analit (pl. élesztőgomba, vörösvértest, baktérium, vírus, fehérje, DNS stb.) elválasztása a médiumban fellelhető, mérést zavaró elemektől vagy az analit fókuszálása a mérőrendszer mérési pontjaira. A kutatási munkámban a kiválasztott négy elválasztási módszert járom körül és vizsgálom meg első körben különböző polisztirol mikrogyöngyök használata mellett, melyek bizonyos peremfeltételek esetén jól tudják modellezni az élő organizmusokat. Ezt követően a kapott eredményeket összevetem szimulációs eredményekkel és az élő organizmusokon (*Escherichia Coli*, vörösvértest, *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba és HeLa sejt) elvégzett kísérleti eredményekkel is. Az integrált elválasztási rendszerek optimált használata növelheti az ezt felhasználó diagnosztikai, monitoring rendszerek érzékenységét és szelektivitását, ami által egy pontosabb és megbízhatóbb eszköz adható a felhasználó (pl. orvos, gyógyszerész stb.,) kezébe.

Az alkalmazott eljárások mellett szükséges foglalkozni a mikrofluidikai rendszerek gyártástechnológiájához kapcsolódó anyagválasztékkal, hiszen az alapanyag tulajdonságai jelentősen befolyásolhatják egy szeparálási módszerhez szükséges felületkezelési eljárások szükségességét, a mintamozgatás módját és a választott módszer hatékonyságát, melyet a további alfejezetek részleteznek.

4.7 Mikrofluidikai rendszerek anyagválasztéka

A MEMS technológia alapját adó gyártástechnológiai folyamatok fejlődése, a litográfias eljárás alkalmazása, és ezzel a strukturális elemek nagy felbontású leképezése tette lehetővé a mikrofluidikai eszközök térnyerését és multidiszciplináris kutatási területek összefonódását.

A fluidikai platform anyagának megválasztásakor fontos tényező az anyagköltség, a gyártásidő, a választott anyag biokompatibilitása, optikai áteresztőképessége, vegyszereknek való ellenállása, valamint alkalmazási feladatkörnek megfelelően a csatorna mechanikai tulajdonságai, például deformálhatósága.

A lágy litográfias eljárás során a gyors replika készítésre alkalmas polimerek közül kitüntetett helyet foglal el a polidimetil-sziloxán (PDMS), melyet laboratóriumunkban is használunk. A PDMS szerkezeteket előszeretettel alkalmazzák direkt optikai megfigyelésekhez, fluoreszcens mérésekhez, ugyanis 240-800 nm-es tartományban optikailag áteresztő, csekély autofluoreszcenciával rendelkezik 520, illetve 580 nm hullámhosszon [129]. Emellett gázok számára átjárható, kémiaiilag ellenálló, biokompatibilis. Jó kötési szilárdság érhető el többféle alapfelülethez: szilícium alapú anyagokkal kovalens kötést kialakítva szivárgásmentes csatorna kialakítható. Költséghatékonyság jellemzi: gyorsan – 2 óra alatt – térhálósítható és könnyen gyártható. Kevés hátránya közt meg kell említeni azonban, hogy szerves, apoláros oldószereknek nem ellenálló [129], hidrofób jelleggel rendelkezik, ezért kapilláris rendszerek kialakításakor felületkezelés vagy hidrofil jelleget erősítő adalékanyag hozzáadása szükséges [130] [131]. Az autonóm módon töltődő, kapilláris pumpával hajtott mikrofluidikák esetén a hidrofil jelleget hosszabb távon kell fenttartani. Acsatornafal oxigén plazmás kezeléssel átmenetileg hidrofillé tehető, mely azonban órákon belül ismét hidrofóbbá válik. A negatív hatású láncrendeződési folyamat lassítható, ha a PDMS eszközt vákuumban (10^{-7} Torr) [132], vagy -80°C -on tároljuk [133], illetve megfelelő hőkezelés alkalmazásával [134] a minta akár 100 napon át is megtartja hidrofil jellegét. További megoldás lehet a PDMS komponensekhez kevert felületaktív anyagok, vagy egyéb térhálósodást követő felületkezelési módszerek alkalmazása. Ilyen például a polietilén oxid [135] (PEO 600kDa), mely a PDMS-hez keverve képes $21,5 - 80,9^{\circ}$ között tartósan hidrofillé tenni a polimer felszínét. A Pluronic F127 – mely egy triblock kopolimer: $(\text{PEO})_m(\text{PPO})_n(\text{PEO})_m$, $m = 100$, $n = 65$, molekula súlya = 12 600 – hasonlóképpen viselkedik a PDMS elasztomerhez keverve még térhálósodás előtt. Vizes közegben a hidrofil láncok kidiffundálnak a felületre, mellyel már $2 \mu\text{l/g}$ koncentráció mellett elősegítik a PDMS kontaktszögének $103,8^{\circ}$ -ról $62,8^{\circ}$ -ra történő csökkentését Zhigang Wu et al. vizsgálatai alapján. [136] Tatiana Trantidou et al. [137] protokollja alapján a PDMS peremszögét O_2 plazmában (100W, 1 perc) és 87 %-os poli-vinil-alkoholban történő kezeléssel reprodukálhatóan sikerült csökkenteni $27,1^{\circ}$ -ra.

A PDMS használatánál hátránynak számít még, hogy áramlási tesztek során, nagy nyomás alkalmazásakor [138] deformálódhat. Alternatíva lehet oldószerek ellenállóbb, illetve nagyobb merevségű anyag választása gyártástechnológiában (nagyobb Young's modulus), például polikarbonát (2 GPa), hőre keményedő poliészter ($\sim 1,2$ GPa), poliuretán metakrilát (91 MPa) a PDMS (10:1, 2,5 MPa) helyett. A kísérletek során hibrid platform alkalmazása is lehetséges: például üveggel (Pyrex Glass 63 GPa) vagy szilíciummal (130 GPa) kombinálva. [139]

Laborkörülmények között üveg-PDMS hibrid fluidikával dolgoztunk, melyek közötti szivárgásmentes kovalens kötéshez oxigén plazmában történő felületkezeléssel aktiváltam a felületeket. A választott lágy litográfias módszer technológiai szempontból kis darabszámban is olcsó, gyors laboratóriumi gyártást tesz lehetővé a szükséges paraméterek teszteléséhez, azonban a már véglegesített geometria megvalósítása egy robusztusabb, tömeggyártásra is alkalmas polimer technológia megválasztásával előnyösebb.

4.8 Mintamozgatás mikrofluidikai rendszerekben

A fluidika meghajtására választott módszer (a minta mennyisége, szükséges külső berendezés) jelentősen befolyásolja az eszköz árát és hordozhatóságát. A kereskedelemben leginkább a passzív pumpákon alapuló módszereket részesítik előnyben. [140] Aktív folyadékkezelést jelent: a fecskendőpumpás megoldás, nyomásszabályozás, pneumatikus szelepek alkalmazása és a centrifugális módszerek. Előnyeik, hogy az áramlás szabályozása precíz, nem szükséges anyagspecifikus felületkezelés, viszont az eszköz mobilitását korlátozza.

A passzív pumpákon alapuló megoldások esetén a szubsztrát anyagjellemzői, a porozitás, a kémiai összetétel, a használt folyadék paraméterei (Newtoni, nem Newtoni folyadék) mind befolyásolják az áramlási sebességet. A passzív mikrofluidikai rendszerek meghajtására több módszer is elterjedt: kapilláris erő alapú megoldások [141], légtranszfer alapú módszerek [142], vagy közvetlen nyomásvezérelt módszerek, amelyek alapulhatnak például a kézi erő, a felületi feszültség [143], bizonyos kémiai reakció [144] vagy mágnes [145] alkalmazásán [146].

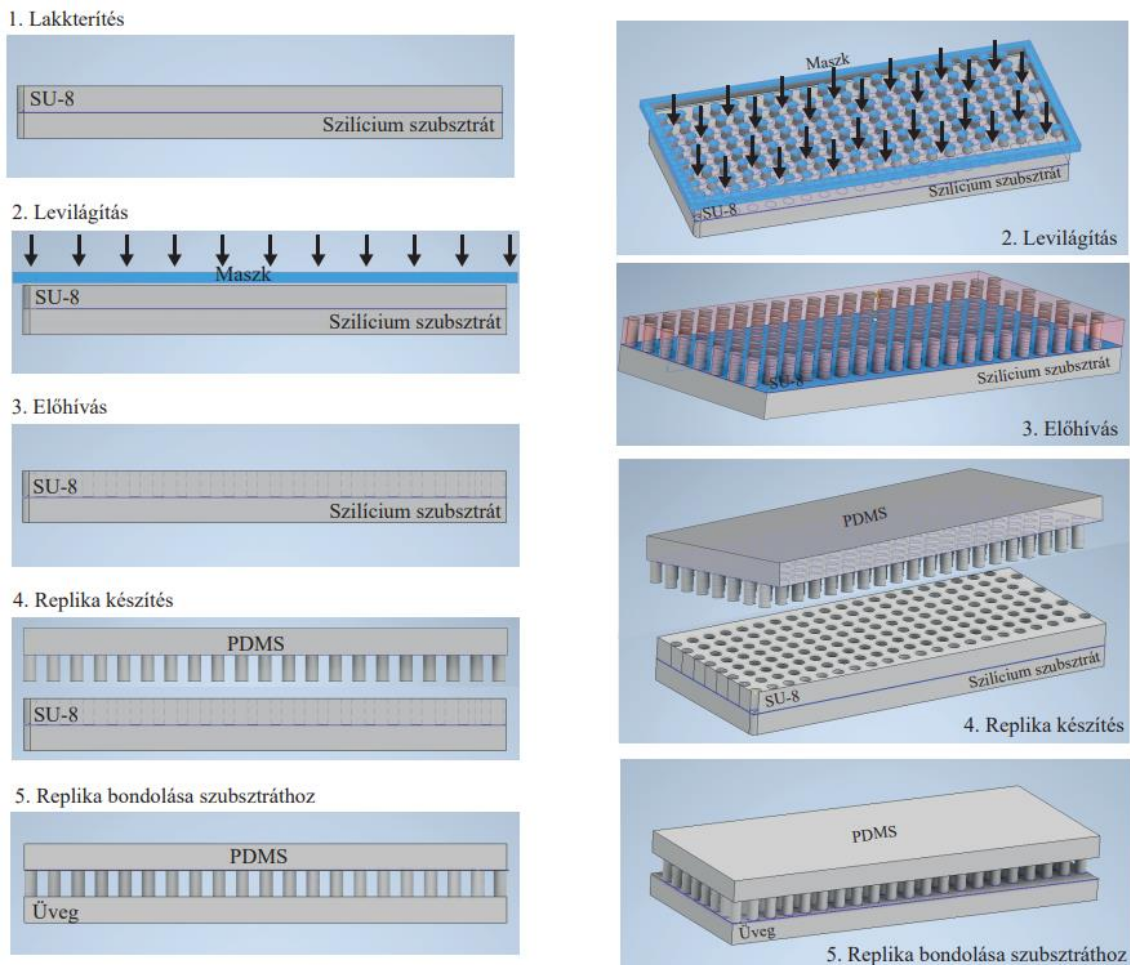
Kísérleteimben elsősorban fecskendőpumpás áramoltatással dolgoztam, viszont a 77 Elektronika Kft.-ben végzett munkám során leginkább autonóm fluidikai egységeket alkalmaztunk, amelynek alap építőeleme a kapilláris pumpa volt.

A kapilláris alapú mintamozgatási módszerek előnyösen alkalmazhatóak immunoassay alapú tesztekre is (pl. baktériumok, fehérjék, vírusok kimutatása humán mintából). Ilyen mikrofluidikai megoldások során elengedhetetlen a fluidikai csatornák felületének módosítása, a megfelelő nedvesítés biztosítása (30-60°-os kontaktszög elérése). A megfelelő felületi feszültség és geometria kialakításával biztosítható, hogy a bemenetre adagolt fix mintamennyiség a negatív kapilláris nyomásnak köszönhetően – homorú folyadék-levegő meniszkusz mellett – beáramlik a fluidikai egységbe [141]. Az áramlási ellenállás (Navier-Stokes egyenletek) és a kapilláris nyomás (Young – Laplace egyenlet) adja a méretezési törvényeket a tervezéshez, az áramlási sebességek hangolásához. A kapilláris szerkezetek számos olyan elemet tartalmaznak, amelyek segítségével a folyadék előrehaladását időzíthetjük, mint például: (megállító-, lassító-, gyorsító-) szelepek, áramlási ellenállások, reakciókamrák, kapilláris szivattyúk és légtelenítő nyílások. A meniszkusz formája hangolható, a csatorna hirtelen kitágulása késleltetheti a folyadék feltöltődését, ami időt adhat a reakció lépésekhez. Az kapilláris oszlopsor alakja, elrendezése és a csatorna keresztmetszete beállítja a szivattyú kapacitását és szívóerejét. Amint a folyadék a szellőzőnyílásokhoz érkezik, megszűnik a nyomáskülönbség, és a platform már nem képes további mintamennyiséget befogadni. Ennek megfelelően a kísérletek során fontos biztosítani a buborékmentes feltöltést.

5. Módszertan

5.1 Mikrofluidikai szerkezetek kialakítása lágy litográfiával

A mikrofluidikai chip geometriáját a CleWin5 alaprajz tervező szoftverben rajzoltam meg. Ezt követően készült el az alaprajznak megfelelő fotolitográfias maszklemez. A króm réteggel bevont plánpárhuzamos üveglemezen direktírással (Heidelberg DWL66 lézeres ábragenerátor) készült el a mintázat, melyet az optikai litográfiához használtunk. Az előzetesen 300°C fokon dehidratált, 4 inches szilícium szeletekre a kívánt fluidikai csatorna magasságának megfelelő rétegvastagságban SU8 negatív fotoreziszt réteget (Kayaku Advanced Materials) vittünk fel centrifugával (Brewer Science Cee 200CBX spin-bake system), majd erre a lakkrétegre képeztük le a maszk mintázatát. Felpörgetett lakk típusának és vastagságának megfelelő módon főzőlapon történt a lakk előzetes szárítása (~ 65°C-on 50 percig; 90°C-on 20 percig). Megfelelő relaxálás után maszkillesztő berendezésben (Süss MicroTech MA6) történt az UV expozíció. A réteg újabb hőkezelési lépéseken esett át (~ 65°C-on 30 percig; 90°C-on 15 percig), majd a mintázat előhívása a lakknak megfelelő oldószerben történt.

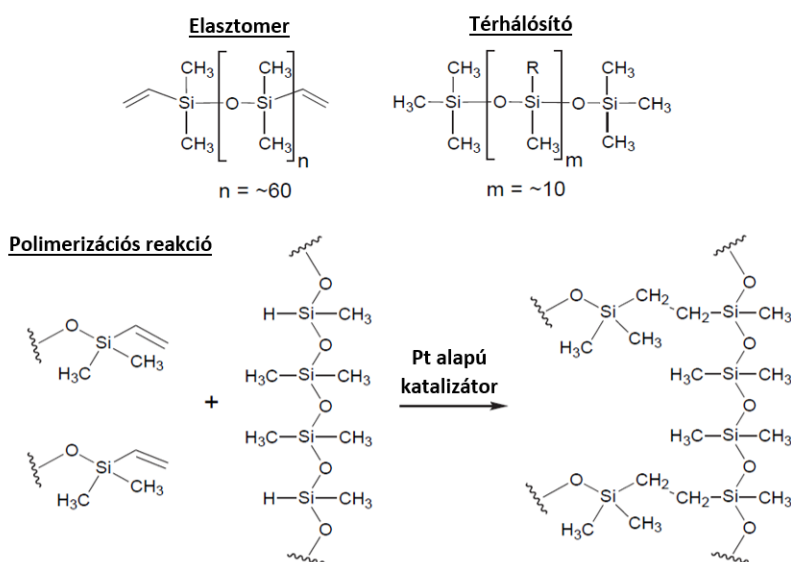


22. ábra: Mikrofluidikai chip kialakításának főbb lépései: a fotolitográfia során negatív fotoreziszt (SU-8) felhasználásával elkészül az öntőforma, majd a PDMS replika. A PDMS struktúra üveghez bondolásával létrejön a zárt fluidikai csatorna.

Mikrofluidikai eszköz gyártásához SU8 negatív fotorezisztet használtunk, ami azt jelenti, hogy előhívás során az UV fény által nem megvilágított, nem polimerizálódott lakk került eltávolításra. Az első réteg megmunkálása után további – eltérő magasságú – lakkrétegek is

felvihetőek a szeletre, lakk száradását és relaxálását követően, egy újabb maszk használatával. A negatív lakkrétegekkel 1µm-től 200µm-ig növelhető a rétegvastagság, azonban az egyes rétegek egymáshoz való illesztéséhez használt illesztőjelek láthatósága jelentősen függ az egymást követő rétegek magasságától. A rétegvastagságnak megfelelő expozíciós energia és idő, illetve hőkezelési paraméterek alkalmazása szükséges. A hívásokat követően elkészül az öntőforma, melyet a többszörös replika öntésre, a PDMS mikrofluidikai rendszer kialakítására tudunk használni, ahogy azt a 22. ábra mutatja.

A replika készítéshez egy két komponensből kikeverhető polidimetil-sziloxán polimert alkalmaztunk (Sylgard 184 – Dow). A szilícium bázisú polimer a vinil csoportokkal lezárt, sziloxán oligomereket tartalmazó elasztomer, és szilikon hibrid kötéseket, valamint platina katalizátort tartalmazó térhálósító 10:1 arányú keverékéből áll elő. A fémorganikus térhálósító reakció során a vinil csoportok kettős kötésének felbontásával Si-H kötések addícióján keresztül alakul ki a Si-CH₂-CH₂-Si láncolat (lásd 23. ábra). [147] A reakció előnye, hogy melléktermék képződése nélkül áll elő a mintahű replika. A megfelelően elkevert komponensek adagolásával szobahőmérsékleten napon belül lezajlik a reakció, de hőkezeléssel meggyorsítható a keresztkötés folyamata. Laborunkban a Si mesterlemezre öntött polimer keverékéből vákuum kamrában távolítottuk el a keverés során visszamaradt buborékokat, majd 65°C -on 90 perc hőkezelést követően lehetett méretre vágni és lyukasztani a térhálósított polimert. A PDMS hőkezelése 200 °C alatt ajánlott. [148]



23. ábra: PDMS előállítása elasztomerből és platina alapú térhálósítóból addíciós reakció során. [147]

A PDMS mechanikai tulajdonságát, rugalmasságát elsősorban az elasztomer, illetve a térhálósító arányának megváltoztatásával hangolhatjuk [149]. Alapvető felületi tulajdonsága, hogy hidrofób – peremszög értéke 90° feletti érték, melynek alakulását a komponensek keverési aránya is befolyásolja [150] – , ezért sok esetben egyéb felületkezelési eljárást is alkalmaznak: UV besugárzás, oxigén plazma kezelés, vagy felületaktív molekulák oltása a mátrixba.

A kialakított mikrofluidikai struktúrát tartalmazó PDMS szerkezetet egy megfelelő ellenoldali szubsztráthoz rögzítve áll elő a fluidikai egység. Az oxigénplazmás felületkezelést

elsősorban PDMS-PDMS, PDMS-üveg vagy PDMS-Si szivárgás mentes kovalens kötéséhez használjuk, mely során a szilícium bázisú felületek között Si-O-Si kötés alakul ki a szilanol csoportok között. Előnye, hogy korlátozott ideig hidrofíllé teszi a felületet – $5-18^\circ$ közötti peremszög is elérhető [151] –, mely pumpával hajtott fluidikai rendszerek esetén megfelelő, rövid távú megoldás. Azonban a kis molekulásúlyú monomer láncok felszínre diffundálásával, a hidroxil csoportok tömbbe vándorlásával, és a szilanol csoportok felszínre kondenzálódásával visszaáll a felület hidrofób jellege.

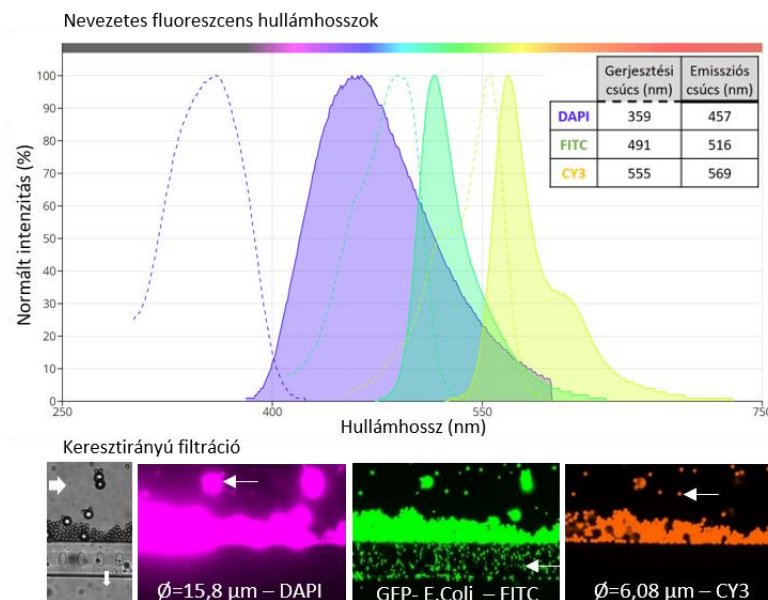
A hibrid, PDMS-üveg fluidikánk előállításához a PDMS-en megfelelő bemeneti és kimeneti portokat alakítottam ki, majd 300 W teljesítményű O_2 plazmával kezeltem mind a PDMS, mind az üveg ellenoldal felületét. A felületkezelést és összeillesztést követően a két oldal között kovalens kötés révén szivárgásmentes bondolás jött létre. Fecskendőpumpával megvalósított áramoltatás esetén a mintainjektálásra tefloncsöveket használtunk, melyek a PDMS rugalmassága miatt közvetlenül a bemenetekre csatlakoztathatóak. A felületi tulajdonságok megtartása miatt igyekeztem a kísérleteket a bondolást követő órákban elvégezni.

Az oxigénplazmás felületkezeléssel bondolt PDMS-üveg hibrid mikrofluidikai eszközökben a kényszerített áramlás fenntartását – az intézetben fejlesztett – Microfluid fecskendőpumpával oldottam meg. A berendezéseket Advantech Geni AQ Runtime környezetben futtatott szoftverrel vezérelhetjük. Több pumpa együttes alkalmazásával a mintaoldat és a segédfolyadékok áramlási sebessége külön-külön szabályozható volt.

5.2 Képképzés és képfeldolgozás

A mikroszkópos vizsgálatokhoz Zeiss Axio Vert A1 invertált fluoreszcens mikroszkópot használtam, nagy sebességű és nagy érzékenységű monokróm kamerával kombinálva. A fluoreszcens polisztirol gyöngyök jellemzően jól követhetőek az egyszerűbb Zeiss Axio IC m1 kamerával, míg a GFP-E. coli fluoreszcens baktériumok vizsgálatához nagyobb felbontású fluoreszcens mikroszkóp és Peltier hűtésű Zeiss Axio 512 mono kamera szükséges. A laterális fókuszálás során a nagy (~ 900 ms) expozíciós idővel készült felvételek lehetővé tették az eltérő méretű fluoreszcens gyöngyök trajektóriáinak vizsgálatát, melyek során a csatornaszélhez viszonyított laterális pozíció került meghatározásra. A fluoreszcens jelöléssel nem rendelkező biológiai minták esetén sötét látóteres mikroszkópos felvételek készültek.

Az alkalmazott Zeiss Axio Vert A1 mikroszkóp a fluoreszcens LED modulja három különböző hullámhossz-tartományban alkalmas a jelölt célminták követésére, amelyek nevezetes fluorofórok után kapták elnevezésüket: DAPI (4,6-diamidino-2-fenil-indol), FITC (fluoreszcein-5-izotiocianát), és CY3 (cianin-3). Ahogy azt a 24. ábra mutatja, gerjesztést követően (szaggatott vonal) egy Stokes eltolódásnak megfelelő emissziós hullámhosszon (folytonos vonal) detektálható a jelölt részecske [152].



24. ábra: Fluoreszcens gyöngyök megfigyelése mikrofluidikai rendszerben a három nevezetes hullámhossz tartományban (DAPI, FITC, CY3) – a színezett emissziós képek 15,8 µm és 6.08 µm átmérőjű gyöngyök (DAPI és CY3), illetve 0,5-2 µm méretű GFP-E. coli (FITC) esetén (fehér nyilak). Kék nyíl jelöli az áramlás és a szűrés irányát.

Általánosságban a jelzővegyületekkel kapcsolatosan kritérium az alacsony toxicitás, a fotostabilitás, a nagy fluoreszcencia intenzitás, a hosszú fluoreszcencia élettartam, a minél nagyobb Stokes eltolódás, hogy a megfelelő sávszűrőkkel a gerjesztő és az emittált fény jól elkülöníthető legyen. A mikroszkóp fényforrásának emissziós spektruma határozta meg a választható fluoreszcens gyöngyök elnyelési sávjait. A fluoreszcens jelöléssel antitestek, szénhidrátok, nukleinsavak, fehérjék, peptidek, oligonukleotidok jelölhetőek kovalensen, így akár aktív enzimek reakciói is megfigyelhetővé válhatnak. Egy adott mérésen belül a változatos méretű fluoreszcens polisztirol gyöngyök mindegyike egyedi emissziós hullámhosszal rendelkezett, ami

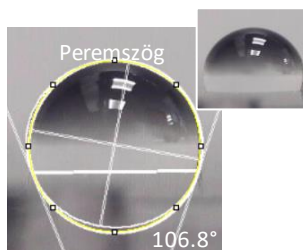
lehetővé tette azok együttes megfigyelését és kimutatásukat a mintában – ezzel a részecskeszeparálás, a célminta dúsítás, vagy a szűrés folyamatának valós idejű követését. Az adott hullámhosszon felvett monokróm képek a ZEN 2.6 (Blue Edition) szoftver többcsatornás képmanipulációs opciójával váltak színezhetővé és együttesen ábrázolhatóvá.

A fluoreszcens gyöngyök alkalmazása mellett a DLD méréseknél fluoreszcensen jelölt molekulával (FITC-Humán szérum albumin – FITC-HSA) festettem meg a mintaoldatot, hogy lehetővé váljon a mintából kiváló, a jelöletlen pufferbe térülő gyöngyök megfigyelése, és az egyes oszlopstruktúrák szeparálási hatásfokának vizsgálata.

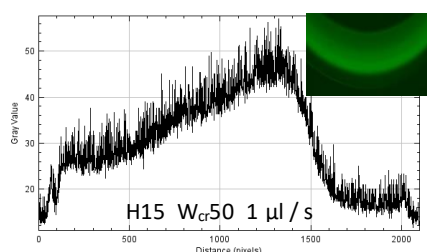
A felvételek kiértékeléséhez az ImageJ 1.52a szoftvert [153] alkalmaztam, mely különböző bővítményeinek segítségével képes többek között (lásd 25. ábra):

- peremszögmérések kiértékelésére – az adott szubsztrát felületi nedvesíthetőségének, hidrofil / hidrofób tulajdonságainak feltárására;
- fluoreszcens oldat laterális koncentrációeloszlásának meghatározására a „Plot profile” funkcióval - mely a pixelek szürkeskálás intenzitásának vonal menti eloszlásfüggvényét adja meg;
- adott területen fellelhető objektumok számának meghatározására szürkeskálás felvételen a gyöngyméret, illetve a pixelszám ismeretében – a „hisztogram” bővítmény kiszámítja és megjeleníti a szürke értékek eloszlásának hisztogramját az aktív képen vagy a kijelölt területen. Részecskés mérések során a fluidikai csatorna keresztmetszetében, a csatorna szélei között felvett definiált területű képeken meghatározható a fluoreszcens részecskékre jellemző szürkeárnyalat (jellemzően fehér), illetve annak pixelszám szerinti gyakorisága. Ennek megfelelően kiszámítható a részecskék relatív gyakorisága az adott területen, illetve a tejes keresztmetszetben.

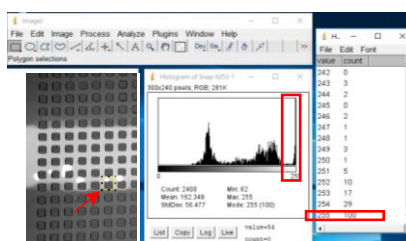
A. Peremszögmérés PDMS



B. Fluoreszcens intenzitáseloszlás - GFP-E.coli



C. Intenzitás hisztogram adott

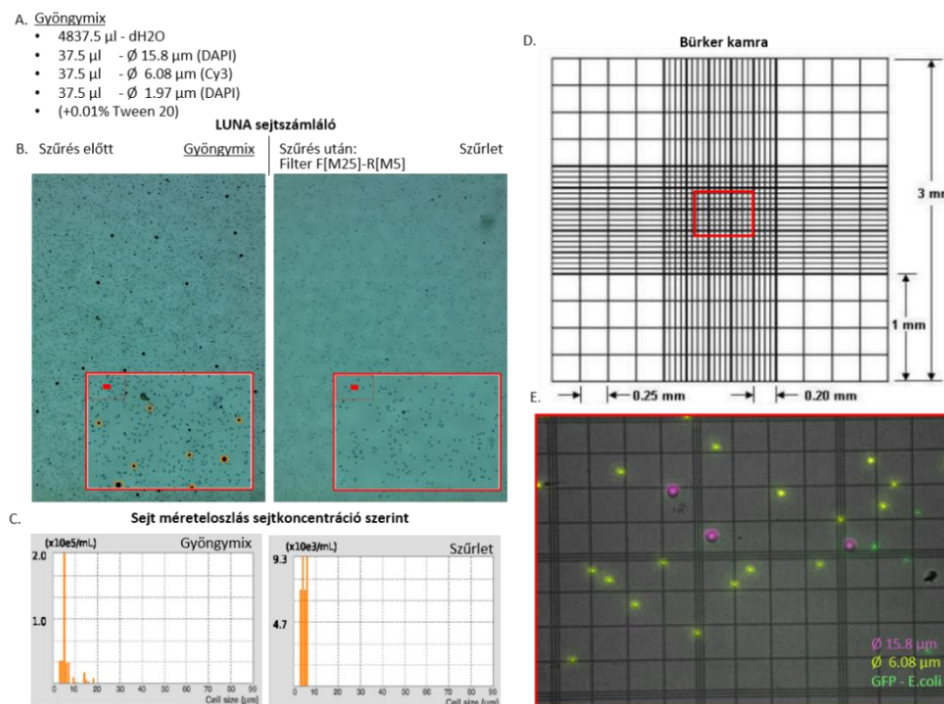


25. ábra: Az ImageJ szoftver bővítményei: peremszögmérés (A), fluoreszcens intenzitáseloszlás (B), intenzitás hisztogram (C)

5.3 Sejtszámlálás

Részecskeoldatok szűrésénél a mintaoldat, valamint a szűrlet összetételét, azok sejtes koncentrációját klasszikus módon, Bürker-kamrában számolva határoztam meg. A számlálás automatizálásához LUNA-II, digitális mikroszkópián alapuló sejtszámlálót (Logos Biosystems) alkalmaztam a vele kompatibilis, C-Chip (DHC-N01 – Neubauer Improved) sejtszámláló kamrákkal. Kisebb gyöngykeresztmetszetek, illetve baktériumok számolásához szükség volt egy alacsonyabb magassággal (10 μm) rendelkező kamra használatára, melyhez Petroff Neubauer Improved számlálókamrát választottam. A LUNA-II berendezés egy kényelmes, automatizált megoldása a sejtszámlálásnak, de a detektálható sejt méret alsó határa 3 μm átmérőnél található, így például baktériumok számlálása nem volt lehetséges ezzel a berendezéssel.

DHC-N01 [154] egy eldobható hemocitóméter, melybe 10 μl minta felhasználásával, Neubauer Improved rácsozással ellátott detektálási régióban leszámoltam a szűrlet összetevőit. A rácsozás 9 nagyobb négyzetre különíthető el, amiből egy egység 0,1 mm^3 mintatér fogat befogadására képes. Egy nagyobb négyzet 16 kisebbre, középső régióban ezek további 16 négyzetre oszthatóak (26. ábra) (a legsűrűbb rácsozás), a kisebb gyöngyök, baktériumok leszámolását itt lehet megfelelő pontossággal elvégezni. Egységnyi térfogatban, 10 db négyzetben számolva a szűrletet, az egyedi négyzetek számolt részecskék átlagolásával azonosítottuk a célminta mennyiségét. A 100 μm mély kamra miatt több fókusz síkban kellett vizsgálni a fluoreszcens gyöngyöket tartalmazó szűrletet. A későbbiekben beszerzésre került egy speciális üveg Bürker kamra - Petroff/ Neubauer Improved – mely már 10 μm magassággal megkönnyítette a számolást. Egy mérés átlagosan 25 percig tartott ezt követően vizsgáltam a szűrlet összetételét.



26. ábra: Szűrés hatékonyságának vizsgálata B-C.) Automatizált LUNA sejtszámlálóval és D-E. Manuális módon Bürker kamrában. A. az alkalmazott gyöngykeverék, B.) Szűrés előtti Gyöngymixfelvétele VS. a F[M25]-R[M5], azaz 25 μm magas fluidikai csatornában 5 μm magas szűrőn szűrve fluidikából nyert szűrlet összetétele, LUNA berendezés jelölésével együtt. C. a LUNA berendezés eredményei: Sejt méreteloszlása sejtkoncentráció szerint. D. Manuális sejtszámlálás Neubauer Improved rácsozáson, E. egységnyi térfogatban számolt fluoreszcens gyöngyökkel és E. coli-val.

5.4 Reagensek

A kísérletekhez használt fluoreszcens polisztirol gyöngyök a Spherotech GmbH ($\varnothing = 0,5 - 1,97 - 5,4 - 6,08 - 10,2 - 15,8 - 16,5 - 20,4 \mu\text{m}$), a Thermo Fisher Scientific (Fluoro Max $\varnothing = 1,1 - 4,8 \mu\text{m}$) és a COMPEL ($\varnothing = 2,9 \mu\text{m}$) forgalmazóktól származtak. A GFP-t expresszáló *E. coli* baktériumokat a Pannon Egyetem Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézete; a HeLa sejteket az Energiatudományi Kutatóközpont Nanobioszenzorika Laboratóriuma (Horváth et al.); a vörösvértest mintákat a 77 Elektronika Kft.; és a *Saccharomyces cerevisiae* élesztősejteket, valamint a puffereket (foszfáttal pufferolt sóoldat – PBS) a Merck Life Science Kft. bocsátotta rendelkezésünkre. A neodímium mágneseket az Euromagnet Hungary Kft. forgalmazótól szereztük be, a mágneses gyöngyöket pedig ($\varnothing = 1,0 - 2,8 \mu\text{m}$) Dynabeads Streptavidin Trial Kit formájában Thermo Fisher Scientific-től.

5.5 Áramlástanai folyamatok modellezése végeelem módszerekkel

Az összetett mikrofluidikai rendszerek megértését, tervezését és tökéletesítését nagyban segíthetik az áramlástanai modellek (Computational Fluid Dynamics (CFD) szimulációk), melyek jó közelítéssel írják le a lejátszódó folyamatokat bizonyos peremfeltételek megadása mellett. A numerikus szimuláció alapja a valóságos rendszerek és folyamatok matematikai modellekkel, véges sok változóval történő közelítő leírása. A legfontosabb aspektusai a vizsgált szerkezetek geometriai reprezentációja, az egyes szerkezeti elemek anyagtulajdonságainak definíciója, illetve a határfeltételek (terhelések és korlátozások) meghatározása. A vizsgált térrész diszkretizációjával a definiált résztérfovatokra érvényes matematikai egyenletek körültekintéssel, de egyszerűsíthetők, így a definiált határfeltételek mellett megoldhatóak. A vonatkozó parciális differenciálegyenletek (Partial Differential Equation, PDE) közelítése olyan modell egyenletekkel történik, mely végeelem modellezésnél valamely függő változót – például fizikai paramétert: nyomást, áramlási sebességet stb. – igyekszik megközelítően definiálni bázisfüggvények lineáris kombinációjával. Az egyszerűsített differenciálegyenletek megoldása hatékony numerikus módszereket alkalmazó szoftverek segítségével lehetséges.

A mikrofluidikai rendszerekben lejátszódó csatolt folyamatok leírásához a Navier-Stokes egyenleten (3. egyenlet) túl a következő egyenletek numerikus megoldása is segít:

Az állandó mágnes által keltett mágneses tér:

$$-\nabla(\mu_0 \nabla V_m - \mu_0 \mathbf{M}_0) = 0 \quad (27)$$

, ahol μ_0 a közeg permeabilitása; V_m az állandó mágneses erőter skalárpotenciálja; \mathbf{M} a mágnesezettség.

Az áramlásba helyezett mágneses részecskére ható erő:

$$\frac{d}{dt}(m_p \mathbf{u}_p) = 3\pi\mu d_p (\mathbf{u} - \mathbf{u}_p) + (\mathbf{m}_{dip} \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (28)$$

, ahol \mathbf{m}_{dip} a részecskék dipólus momentuma, \mathbf{B} a mágneses térerősség.

Valamint a konvekció diffúziós egyenlet:

$$\frac{\partial \mathbf{c}}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla \mathbf{c} = \mathbf{D} \Delta \mathbf{c} + \mathbf{R} \quad (29)$$

melynél \mathbf{c} – jelöli a koncentrációt, \mathbf{D} a diffúziós együtthatót és \mathbf{R} a reakciótagot.

5.5.1 A CFD problémák numerikus megoldására alkalmazható szoftverek

A végelem szimulációs szoftvereket a Navier-Stokes egyenlet megoldására használt módszerek alapján a következőképp lehet csoportosítani:

- Véges térfogatok módszere (Finite Volume Method - FVM): COMSOL, CFD-ACE+, FLUENT, Star CD;
- Lineáris parciális differenciálegyenlet: FlexPDE, Calculix
- Szilárdtest mechanikai problémakörre jól alkalmazhatók: Abaqus, Adina, I-Deas, Nastran, ANSYS.

A folyadék - szilárdtest interakciókat (FSI) kezelni képes komplex problémakörök feldolgozására az ANSYS és a COMSOL programok a legelterjedtebbek [155]. A kutatócsoport a mikrofluidikai rendszerek szimulációjához az utóbbit (COMSOL MultiPhysics (5.3a) verzió) használja.

CFD modellezésnél a geometria megtervezése után egy megfelelő diszkretizációt, vagyis hálófelosztást kell definiálni, mely számítási csomópontokra osztja a kijelölt területet. A COMSOL négy fő 3D elemstruktúrát különböztet meg: tetraéder, hexaéder, háromszög prizma és piramiselemek. Ezek 2D leképezése a három- és négyszög alakú elemek [156]. A számítási hibák elkerülése miatt célszerű minél jobb felbontású hálót definiálni. Erre több stratégia is létezik: finomítható a háló manuálisan, de létezik automatikus megoldás is, például a *Globális adaptív háló finomítási módszer* [157]. Ebben az esetben a program egy hibabecslési stratégia alapján hoz létre új hálót: oly módon, hogy a legnagyobb lokális hibalehetőség környékén – például sarkok, falak, anyaghatárok mentén – besűríti a hálót, vagyis egy finomabb felbontású határréteg hálót hoz létre. A modell által generált virtuális mezőben a szomszédos rácspontok nem függetlenek egymástól, így azokon a rácspontokon, melyek szomszédokkal nem határoltak (pl. ki- és bemenetek, falak mentén) rögzíteni kell a peremértéket egy konstans érték, vagy referencia értékkel. A mikrofluidikai szimulációkban például egyik leggyakrabban használt határfeltétel a „no slip – megcsúszás mentes” feltétel, amely a parabolikus áramlási profil következtében a falak mentén kialakuló jellegzetesen nulla sebességértéket állít be. Peremfeltételként függvény is megadható, de a kimeneti értékek bemeneti értéként történő ismételt felhasználása is lehetséges, ami lehetővé teszi a periodikus peremfeltételek alkalmazását. Ez a módszer tette lehetővé például, hogy a vizsgált aszimmetrikus hullámcatornában a kísérletek során nem fókuszálódó mikrométer közeli átmérőjű gyöngyök viselkedését numerikusan vizsgálhassuk és megjósolhassuk hosszabb fluidikai egység alkalmazása esetén.

5.5.2 Végeelem modellek a kísérleti elrendezések leírására

A kísérleti eredmények értelmezéséhez megfelelő peremfeltételek mellett lefuttatott végeelem modelleket is felhasználtunk, így COMSOL szimuláció készült:

- a determinisztikus oldalirányú eltérítésről (DLD),
- a laterális fókuszálásról (LF), és
- a magnetoforetikus folyamatokról.

A DLD szerkezet esetén az áramlási viszonyokat aszimmetrikus és szimmetrikus oszlopok között modelleztem, azonosítva a kialakuló nyomásanizotrópiát, ami a kísérletek során megfigyelt transzportfolyamatok értelmezését segíti.

Laterális fókuszálás vizsgálata során a kialakuló sebességtérre szuperponált méretfüggő pályavonalszámításokat végeztem:

- a csatorna keresztmetszetben kialakuló gyöngyeloszlás szemléltetésére (Poincaré térkép),
- a fókuszálás hatékonyságának demonstrálására, meghatározva a fluidikai csatornán keresztülhaladó gyöngyök bemeneti és kimeneti y koordinátái közötti függvényt,
- a kialakuló Dean örvények körüli sebességmezők szemléltetésére különböző átmérőjű csatorna keresztmetszetekben, illetve az örvényközpontok és a részecskék egyensúlyi pozíciói vándorlásának leírására a csatornageometria és az áramlási sebességek függvényében.

Hasonlóan a fentiekhez szimulációk készültek a magnetoforetikus folyamatok értelmezéséhez is, ahol azt vizsgáltam, hogy a különböző áramlási sebességek, valamint a kamrában kialakított oszlopageometriák miatt kialakuló lokális áramlási viszonyok hogyan befolyásolják a mágneses csapdázás hatékonyságát.

A szimulációs eredményeket minden esetben összevettem a kísérletek útján kapott eredményekkel, így képet kaptam a **model megbízhatóságáról a megadott** a határfeltételek és a bemeneti paraméterek mellett.

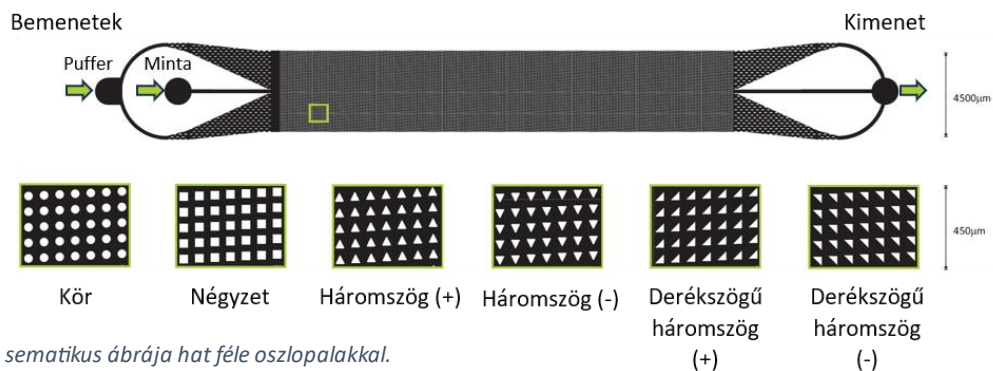
A modellként alkalmazott gyöngyök és a biológiai minták között morfológiai, méretbeli és összetételi eltérés is van, nem beszélve a biológiai minta összenyomhatóságáról. A legtöbb alkalmazott gyöngyöt a Shperotech-től [158] rendeltük. A polisztirol gyöngyök organikus festékanyagot és nátrium-azidot tartalmaznak (mikrobaellenes szer), felszínük karboxil csoportokkal borított. Sűrűsége $1,06 \text{ g/cm}^3$, mely a vízéhez közeli, az alkalmazásban 1 w/v\% koncentrációban további hígításra került. Az E.coli denzitása $1,080 - 1,100 \text{ g/cm}^3$ [159], a vörösvértest átlagos sűrűsége $1,110 \text{ g/cm}^3$ [160], az élesztőgomba *Saccharomyces cerevisiae* denzitása $1,0952 \text{ g/cm}^3$ [161]. A pálcika alakú baktériumok, bikonkáv alakú vörösvértestek összenyomhatóak, és alakjuk miatt is könnyebben vesznek fel változatos mozgásformát áramlásban, vagy változtatják alakjukat áramlási sebességek emelésével, mely a szeparációt jelentősen befolyásolja legyen az DLD, laterális fókuszálás, és más módszerek. Egy végeelem alapú szimuláció paraméterfüggésének vizsgálata, 3D modellek futtatása már komoly akadályokba ütközik heterogén oldatok alkalmazásakor, így minden esetben a kísérleti megközelítés szükséges.

6. Eredmények

6.1 Determinisztikus oldal irányú térítés

A determinisztikus oldal irányú eltérítés (DLD) széles körben alkalmazható mikrofluidikai rendszerekben szűrési, szeparálási feladatokra, illetve célminta dúsításra a mintaoldatban. ARUBA – (Rapide Urine Bacteria Analyzer), azaz gyors húgyúti baktérium ellenőrző mérőeszköz fejlesztése során a cél, baktériumok vizeletből történő szűrése és kimutatása volt, a $4\ \mu\text{m}$ alatti tartományban. A vizeletben $1 - 60\ \mu\text{m}$ mérettartományban találhatóak alakos elemek, ennek megfelelően egy kaszkádszerű szűrés lehetne optimális, mely fokozatosan szigorítja a kritikus keresztmetszetet, miközben a D_c feletti mérettel rendelkező részecskéket régióként szegregálja a mintából, elkerülve ezzel a dugulást és a célmintaveszteséget. Az első DLD fokozat vizsgálata során adott elméleti cut-off érték alapján történt az oszloprendszerek kialakítása: az oszlop- és résméret, a tömbperiódus, a csatornahossz változatlanul tartottam, viszont különböző oszlopalakokat alkalmaztam. A pillérek alakja és konfigurációja nemcsak a részecskékre gyakorolt DLD hatást, hanem a lamináris áramlás réteghatárai mentén történő elegyedést, és a kialakuló koncentrációprofil is erősen befolyásolja. A kritikus átmérő (D_c) az oszlopok közötti résekben kialakuló áramvonalak eloszlása alapján változik. Így meggyőződésem, hogy az oszlopalak helyes megválasztásával hangolható a kritikus keresztmetszet, melynek elsődleges feladata a dugulásmentes áramlás biztosítása.

Kísérleteim során hat különböző oszlopgeometriát alkalmaztam: kör, négyzet és háromszög alapú hasábokat, különböző tájolással az elválasztás hatékonyságának összehasonlítására – alakjuktól és elrendezésüktől függően (lásd 27. ábra).



27. ábra: DLD sematikus ábrája hat féle oszlopalakokkal.

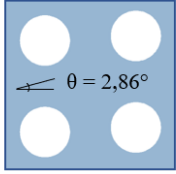
A szerkezet két bemenettel és egy kimenettel rendelkezik. Az első, ketté ágazó bemenet a köpenypufferé; második bemeneten a fókuszált mintaoldatot adagoltam. A teljes mikrofluidikai eszköz $45\ \text{mm}$ hosszú és $4,5\ \text{mm}$ széles, azonban a DLD oszlopsor csak $25,2\ \text{mm}$ hosszúságú. Az oszlopperiódust $N=20$ mértékűre, az oszlopok közötti távolságot $G=40\ \mu\text{m}$ -re választottam (lásd 4. táblázat). A D_c értékek az oszlopok alakjával és tájolásával változnak. E. Pariset [63] geometriai állandóit figyelembe véve az elméleti kritikus átmérő a bemutatott oszlopalakok közül a kör alapú oszlopok esetén $D_c = 13,3\ \mu\text{m}$; a négyzet alapú oszlopoknál $D_c=7,1\ \mu\text{m}$; a háromszög alapúnál (+) $D_c=11,1\ \mu\text{m}$ az egyes oszloprendszerekben.

Az egyes szerkezetek elválasztási hatékonysága a részecskék központosított áramlástól való elhajlási tartományának feltérképezésével került számszerűsítésre. Fluoreszcensen jelölt polisztirol mikrogöngyök ($\varnothing= 16,5\ \mu\text{m}$ (FITC) és $20,4\ \mu\text{m}$ (Cy3)) szuszpenzióját humán szérumbalbumin

oldatba kevertem (FITC-HSA 60mg/l), amely támaszfolyadékokkal fókuszálva haladt a csatorna középvonalaiban 0,2 $\mu\text{l/s}$ bemeneti térfogatárammal, míg a köpenyfolyadék áramlási sebessége 1,8 $\mu\text{l/s}$ volt.

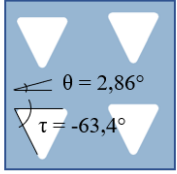
Paraméter jelölése	Jelentése	Értéke
N	oszlop periódus	20
G	oszlop közti résméret	40 μm
D _p	oszlop szélesség	50 μm
λ	oszlop középpontok közti távolság	90 μm
Θ	soreltolás ferde szöge	2,86°
ε	tömbeltolás tört	0,05
h	csatorna magasság	50 μm
L	DLD csatorna hossza	25160 μm
N _c	oszlopok száma a csatorna szélességében	50

Kör



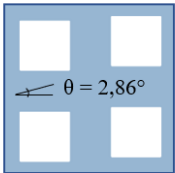
$\theta = 2,86^\circ$

Háromszög (-)



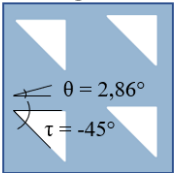
$\theta = 2,86^\circ$
 $\tau = -63,4^\circ$

Négyzet



$\theta = 2,86^\circ$

Derékszögű háromszög (-)



$\theta = 2,86^\circ$
 $\tau = -45^\circ$

4. táblázat DLD oszloprendszer paramétereit

A fluoreszcens mintaoldat, valamint a gyöngyeloszlás kimenet közelében történő vizsgálatával és összehasonlításával viszonylag pontos képet lehetett adni az adott mérettel rendelkező részecskék térülésének mértékéről, illetve az oszlopalak hatásáról. A FITC-HSA oldat és a köpenyfolyadék elegyedésének mértékét a relatív fluoreszcens intenzitás rögzítésével vizsgáltam a csatorna keresztmetszetében annak elején és végén. Az oszlop aszimmetriákból adódó térben inhomogén hidrodinamikai ellenállás által létrehozott nyomáseloszlást és a keresztirányú elegyedés folyamatát végelem szimulációk eredményeivel is összevettem a részecskeszeparálást rontó tényezők pontosabb megértése érdekében. Az elvégzett mérések kísérleti körülményeit az 5. táblázat foglalja össze. A DLD szerkezetben az oszlopperiódus 2,86°-os szöggel (θ) felfelé halad, sikeres eltérítés esetén a kritikus átmérő feletti részecskék várhatóan a felső ágba jelennek meg – míg az ettől kisebb részecskék fókuszálva maradnak, és a középső ágba lépnek ki a csatornából, viszont az alsó ágba nem jelennek meg részecskék. Amint később látjuk, a szimmetrikus pillérforma – kör, négyzet – esetében teljesültek is ezek az elvárások, aszimmetrikus esetben azonban nem. Az oszlop élek lejtése és orientációja szintén befolyásolja az elválasztás hatékonyságát, mivel anizotrópiát idézhet elő az áramlásban.

	Típus	Összetevők	Emissziós spektrum	Áramlási sebesség	Mérés célja
I.	Minta	20,4 μm FITC-HSA	Cy3 FITC	0,2 $\mu\text{l/s}$	HSA eloszlás összehasonlítása a bemenet és a kimenet között, gyöngyök relatív eloszlása a kimenetnél
	Köpeny áramlás	PBS puffer		1,8 $\mu\text{l/s}$	
II.	Minta	20,4 μm 16,5 μm FITC-HSA	Cy3 FITC	0,2 $\mu\text{l/s}$	gyöngyök relatív eloszlása és pályagörbéje
	Köpeny áramlás	PBS puffer		1,8 $\mu\text{l/s}$	
III.	Minta	GFP-E. coli Alexa Fluor 350 karbonsav	FITC DAPI	0,2 $\mu\text{l/s}$	Alexa Fluor 350 eloszlás a bemenetnél és kimenetnél, valamint E. coli pályagörbéje és anizotrópia által befolyásolt eloszlása a kimenetnél
	Köpeny áramlás	PBS puffer		0,9 $\mu\text{l/s}$	

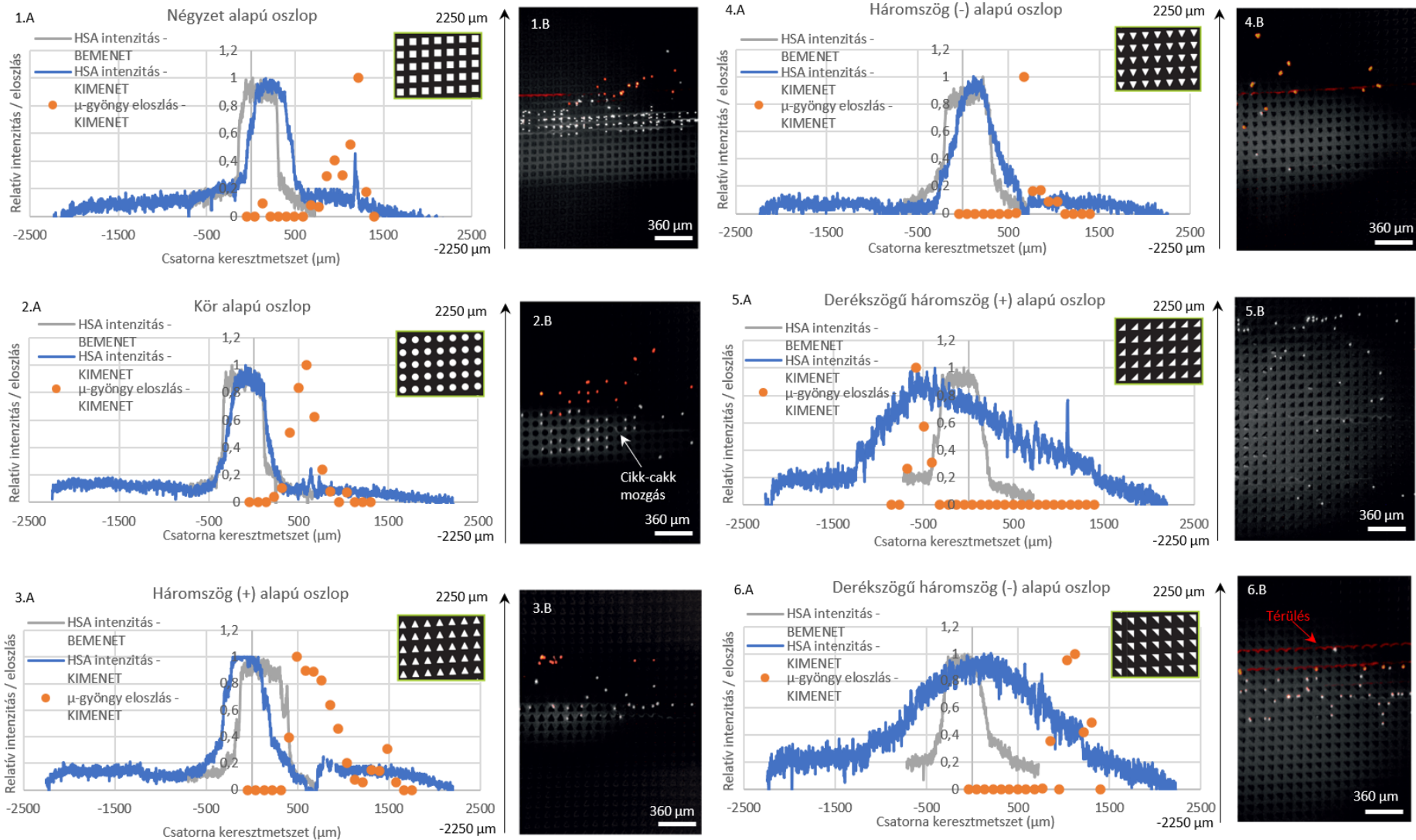
5. táblázat Három kísérleti terv az oszlopalakok szerepének vizsgálatához

A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok során a csatorna teljes szélességét csak több felvétel összeillesztésével lehetett végigpásztázni a legkisebb nagyításban is, így azt egységesen három egységre osztottam: 17-16-17 db oszloppal. A kiértékelések során az Image J szoftver felhasználásával elemeztem a csatorna kimenete közelében kialakuló részecskeeloszlást. A teljes képet $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ területű tartományokra osztottam ($90\mu\text{m}$ az oszlop periódus), a fluidika geometriájának megfelelően középpontosan koordináta értékek rendeltem a fluoreszcens gyöngyökhöz. A polisztirol gyöngyök emissziós spektrumait úgy választottam meg, hogy elkülönüljenek egymástól és a fókuszált mintaáramlástól is. Magas expozíciós idő esetén a gyöngypálya, alacsonyabb expozíciós idő esetén a fluoreszcens HSA eloszlásáról készültek felvételek a csatornahossz 4 pontján. A CCD kamerával rögzített felvételeket a csatornánként digitálisan színeztem, így a különböző hullámhosszokon fluoreszkáló eltérő méretű gyöngyök elhelyezkedését a csatorna végső traktusában együttesen lehetett vizsgálni.

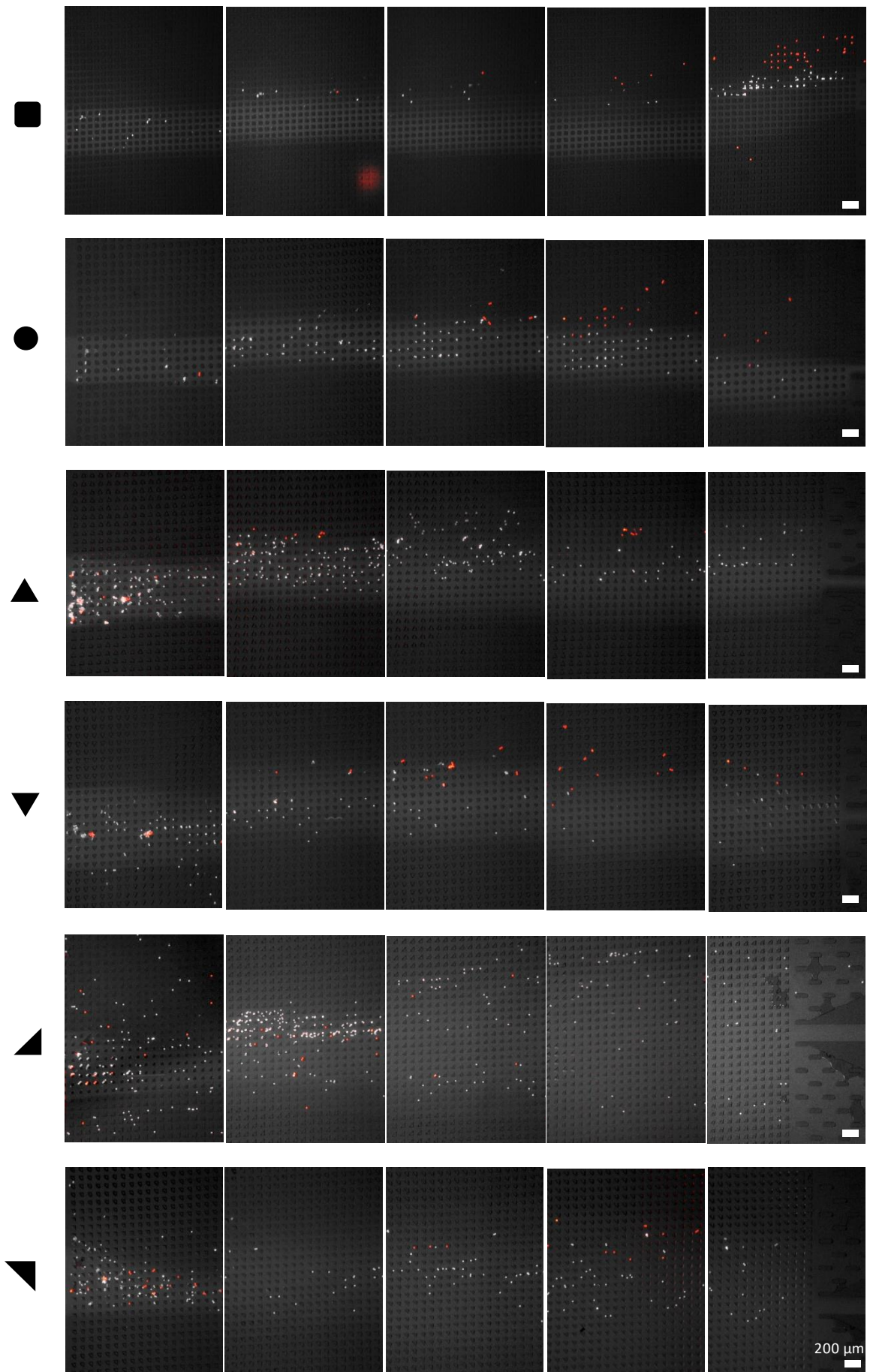
A mérési eredményeket a 29. ábra foglalja össze a következő oldalon 6 oszlopalakra vonatkozóan. Megfigyeltem a HSA eloszlást a csatorna elején (szürke) és végén (kék), illetve a $20,4 \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngyök eloszlását a csatorna kimeneten (A). Vizsgáltam továbbá a két gyöngypopuláció ($\varnothing = 16,5 \mu\text{m}$ - fehér és $\varnothing = 20,4 \mu\text{m}$ - piros) egymáshoz viszonyított helyzetét és mozgását a csatorna hosszában, melyet a 30. ábra is mutat a csatorna mentén.

6.1.1 Oszlopalak hatása a részecskezeparáció hatékonyságára

A kör és a négyzet alakú oszlopok szimmetrikus szerkezetének köszönhetően, szinte semmilyen hatással nem voltak a HSA eloszlására, a mintaáram a csatornán keresztül fókuszált maradt, és a DLD struktúrát a középső ágon keresztül a kimeneten hagyta el (29. ábra - 2.A.). A négyzet szerkezetű oszlopsorban jobb elválasztási hatékonyságot látunk (29. ábra - 1.A.), mint a kör alakúban. Ez a tendencia a gyöngypályákon is megmutatkozik (29. ábra – 1.B. és 30. ábra). A kisebb gömbök ($\varnothing = 16,5 \mu\text{m}$ - fehér) cikk-cakk mozgással haladnak a csatornában, és a HSA oldatban koncentráálódtak a kör szerkezetű oszlopsor végén. Ezzel szemben a négyzet alakú oszlopban a kisebb gyöngyök is eltérítődtek. Ez azt sugallja, hogy a DLD geometriáknak a kritikus átmérője kör oszlopok esetén $16,5 \mu\text{m} < D_c < 20,4 \mu\text{m}$, négyzet keresztmetszetű oszlopok esetén pedig $D_c \leq 16,5 \mu\text{m}$.



23. ábra: A hat oszlopalak szeparációs hatékonyságának összehasonlítása. A fókuszált fluoreszcens HSA oldat pozíciójának összehasonlítása a 4,5 mm széles fluidika elején és végén; valamint a 20,4 μm átmérőjű gyöngyök térülésének mértéke a fluidika végén (A). A 16,5 μm (fehér), illetve 20,4 μm (piros) átmérőjű gyöngyök térülése a fluidikában (B).



29. ábra: A hat oszlopok hatékonyságának összehasonlítása. Teljes fluidika mentén a középső régióban: fluoreszcens HSA oldat pozíciójának és elegyedésének 16,5 μm (fehér) illetve 20,4 μm (piros) gyöngyök esetén.

A közel egyenlő oldalú háromszög alapú oszlopokat tekintve a 20,4 μm átmérőjű gyöngyök szintén eltértek. Az oszlopperiódushoz képest ellenkező irányban álló háromszög (-) esetén kisebb elhajlási szögben mozdultak el, közelebb maradtak a fókuszált fluoreszcens oldathoz (28. ábra - 4.A.). Az oszlopperiódussal egyező irányban álló háromszög (+) esetén nagyobb szórást mutat a gyöngyök eloszlása a DLD oszloprendszer felső szakaszában (28. ábra - 3.A.). Ugyanezen struktúrákban a 16,5 μm és a 20,4 μm átmérőjű gyöngyök elválasztását vizsgálva a háromszög (+) szerkezet jobban teljesített, hiszen míg a 16,5 μm átmérőjű gyöngyök a fluoreszcens oldat felső határán helyezkedtek el a kimeneti csatornában, addig a háromszög (-) szerkezet esetén 16,5 μm átmérőjű gyöngyök a fluoreszcens oldatban maradtak. Ez azt sugallja, hogy ezeknek a geometriáknak a kritikus átmérője háromszög (+) szerkezetű oszlopok esetén $D_c \leq 16,5 \mu\text{m}$, háromszög (-) szerkezetek esetén pedig: $16,5 \mu\text{m} < D_c < 20,4 \mu\text{m}$.

A derékszögű háromszög alapú oszlopokból felépülő rendszereket elsősorban a sejtorientációt befolyásoló tulajdonságuk miatt vizsgáltam. Ezekben a DLD szerkezetekben erőteljes áramlási anizotrópia jelenségét tapasztaltam [82], mely az alkalmazott oszloprendszer aszimmetriájából fakad. Ez jelentősen befolyásolja a jellemző kritikus átmérő értékét, megváltoztatja az áramlási pályavonalak szerkezetét és ennek megfelelően váratlan részecske mozgást generál. A derékszögű háromszög alapú oszloprendszerben a fluoreszcens oldat fókuszáltsága leromlik, és a DLD rendszer végére érve legyező szerűen kinyílik. Az oszlopperiódus irányába mutató háromszögek (derékszögű háromszög (+)) esetén a 20,4 μm átmérőjű gyöngyök inkább a tervezett periódussal ellentétes irányban térültek (28. ábra - 5.A.). Az ellentétes irányban álló oszlopok (derékszögű háromszög (-)) esetén (28. ábra - 6.A.) a tervezett irányban mozdultak el, míg a kisebb gyöngyök a fluoreszcens oldatban maradtak.

A 20,4 μm átmérőjű gyöngyök relatív térülését figyelembe véve állítottam fel DLD szerkezetek különböző oszlopgeometriákra vonatkozó jósági sorrendjét, melyet a 6. táblázat foglal össze. Az eltérést a kimeneti fluoreszcens oldat intenzitás maximumának pozíciójához mérten állapítottam meg a 28. ábra grafikonjai alapján.

Oszlopalak	A 20,4 μm átmérőjű gyöngyök eltérése	Térítési hatások sorrendje
Négyzet	1050 μm	1.
Derékszögű háromszög (-)	1003 μm	2.
Kör	676 μm	3.
Háromszög (+)	582 μm	4.
Háromszög (-)	560 μm	5.
Derékszögű háromszög (+)	0 μm	6.

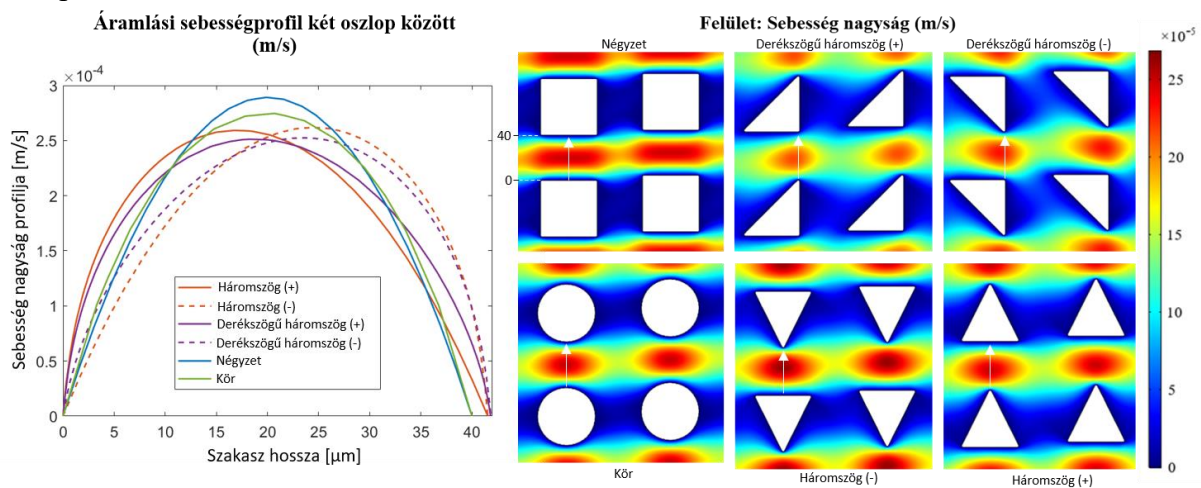
6. táblázat 20,4 μm átmérőjű gyöngyök relatív térülése az egyes oszlopgeometriákkal rendelkező DLD mikrofluidikai rendszerekben, a fluoreszcens oldat intenzitásmaximumához viszonyított eltérés alapján.

Igyekeztem az E. Pariset [63] által javasolt hatékonysági sorrendet – melyet N=10 periódusig teszteltek – a saját mérések alapján is felállítani. A szeparálási hatékonyság sorrendje N=10 periódussal rendelkező DLD szerkezetek esetén: négyzetes > háromszög (+) > kör > háromszög (-), balról jobbra növekvő D_c értékkel. A saját, N = 20 periódussal rendelkező szerkezetek esetén szintén hasonlóan adódik: négyzet > kör > háromszög (+) > háromszög(-).

Jegyezzük meg, hogy az egymáshoz hasonló eltérülési értékeket produkáló szerkezetek – kör, háromszög (+), háromszög (-) – értékek között nehéz egzakt sorrendet kialakítani, a lejátszódo jelenségeket nagyban befolyásolja például az alkalmazott áramlási sebesség is. Megállapítható, hogy a 6. táblázatban szereplő adatokat, illetve a 28. (63. oldalon) és a 29. ábra (64. oldalon) grafikonjait és gyöngyeloszlásait is elemezve egyértelműen **a négyzetes oszlopszerkezet adja a legjobb megoldást a DLD típusú részecskeszeparációs feladatokban**, ebben az esetben már a fluidikai csatorna elején eltérülnek a 16,5 és 20,4 μm átmérőjű gyöngyök is a fókuszált fluoreszcens oldatból.

6.1.2 Az áramlási sebességtér hatása a részecskemozgatásra DLD rendszerekben

A részecskék mikrofluidikai rendszerben való viselkedését, így a DLD szerkezetekben az eltérülés mértékét a kialakuló sebességtér, illetve ennek megfelelő nyomásviszonyok is befolyásolják. 31. ábra reprezentálja az egyes oszlopok közti résben (40 μm) kialakuló áramlási sebességtér – végeelem szimulációk alapján számolva. A szimulációk eredményei jól alátámasztják, hogy a négyzetes oszlopok esetén miért jobb a szeparációs hatások, a többi oszlopalkalakkal összehasonlítva.



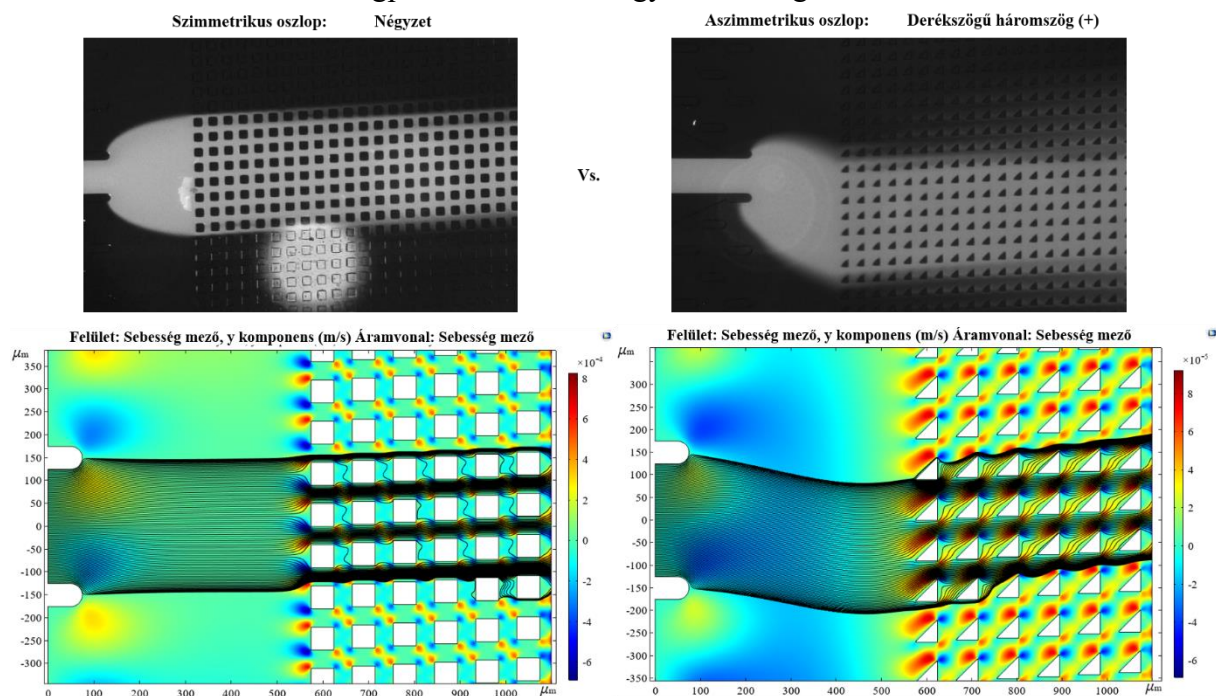
30. ábra: DLD szerkezetekben, az oszlopok között kialakuló sebességprofilok – végeelem szimuláció.

Megfigyelhetjük, hogy a négyzet alapú oszlopok esetén a szimmetrikus oszlopközben jelentősen megnő a maximális áramlási sebesség, mely az oszlopok közötti csatornában végig fennáll, viszont két egymást követő oszlop között az áramlási sebesség szinte zérusra esik. A profilban kialakuló nyomásviszonyok elősegítik a részecskék felfelé irányuló elmozdulását.

A kör és háromszög alapú oszlopok esetén a sebességek maximuma nem olyan markáns, kevésbé ér el olyan szélsőértékeket, mint a négyzet alapú oszlop esetén – ez a részecskékre ható kisebb emelőerő kialakulását jelenti. A háromszög alapú oszlopok esetén sebességprofilok jelentős aszimmetriát mutatnak, a sebességmaximumok helye a háromszögek csúcsainak irányába tolódik el a csatornában. Vegyük észre, hogy ez a különbség a sebességprofilok fel és lefutó oldalán tapasztalható meredekségben – vagyis a nyomásgradiensek nagyságában – is megnyilvánul. Ezek a jelenségek a felfelé mutató háromszögek (+) esetén gátolja, lefelé mutató háromszögek (-) esetén

segíti az eltérítést. A felfelé mutató derékszögű háromszög alapú oszlopok esetén a szeparációs hatást nagyban degradálja a kialakuló áramlási anizotrópia, amelyet a következőkben tárgyalok.

A derékszögű háromszög alapú oszlopok esetén tapasztalható áramlási anizotrópia jelenségének szemléltetésére egy, az oszloprendszer bemenetén kialakuló nyomásprofil lehet a legszembeütőbb. A 31. ábra az oszloprendszerek közül példaként kiemelt szimmetrikus négyzet alapú és felfelé mutató aszimmetrikus derékszögű háromszög (+) alapú oszlop áramlási térre gyakorolt hatásait veti össze. A HSA oldat fluoreszcens felvételén jól látszik, hogy az oldat eloszlása a bemeneti csatornánál és az oszlopok között is a csatorna középvonalára szimmetrikus a négyzet alapú oszlopoknál. Ezzel szemben jelentős aszimmetria mutatkozik az oszlopok sarkainál módosuló sebességmező mintázatában, épp úgy, ahogy az áramvonalak elrendezésében is. Az aszimmetrikus derékszögű háromszög (+) alapú oszlopok esetén az átfogó oldal irányában megnő a virtuális hidrodinamikai ellenállás, ennek megfelelően a nyomás is az oszloprendszer felső szakaszában. Ez a jelenség a fluoreszcens oldat kisebb ellenállás felé való elmozdulását segíti elő. Ebben az esetben a sebességmező lokális y komponensei is nagyobbak a háromszög csúcsainak irányában, ami a mintaoldat eltérítését, és emiatt a szeparálási hatások romlását okozza. Az előzőekben leírt aszimmetria a négyzet alapú oszlopok esetén sem a fluoreszcens oldat eloszlásában, sem a sebességprofilokban nem figyelhető meg.



31. ábra: Áramlási anizotrópia jelensége: a fókuszált HSA oldat térülése a DLD rendszerben szimmetrikus (A) és aszimmetrikus (B) oszlopok esetén a bemeneti csatornánál (fluoreszcens felvétel), illetve a kialakuló, végeelem modellel számolt sebességmező (y sebességkomponens) és ennek függvényében kialakuló áramvonalak.

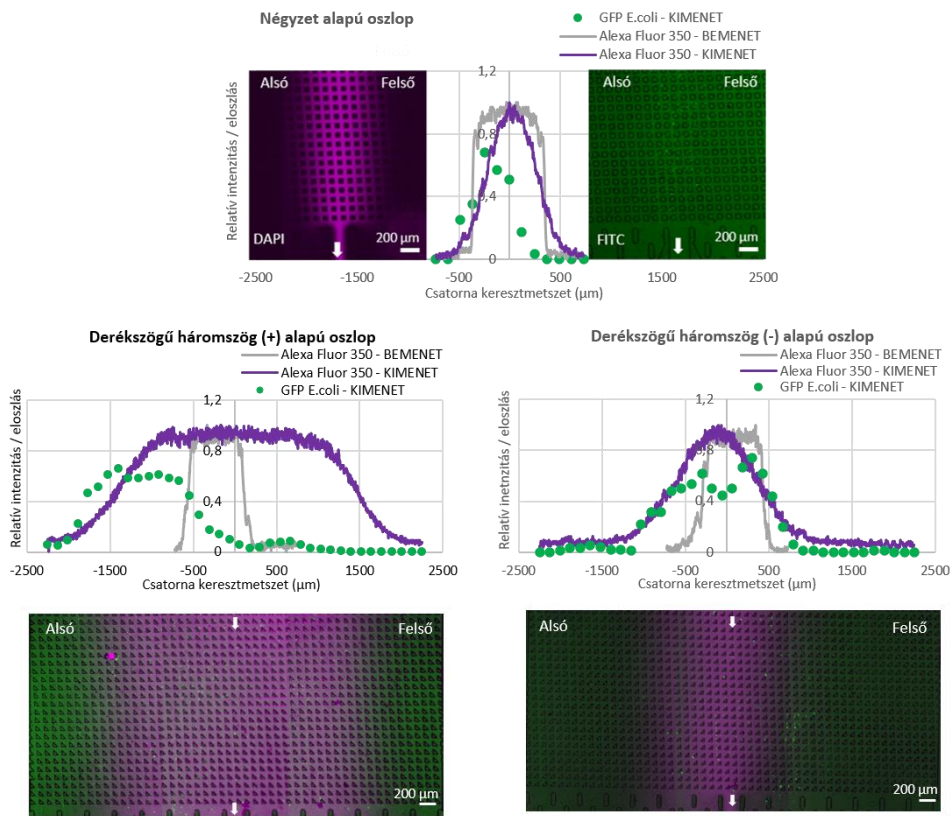
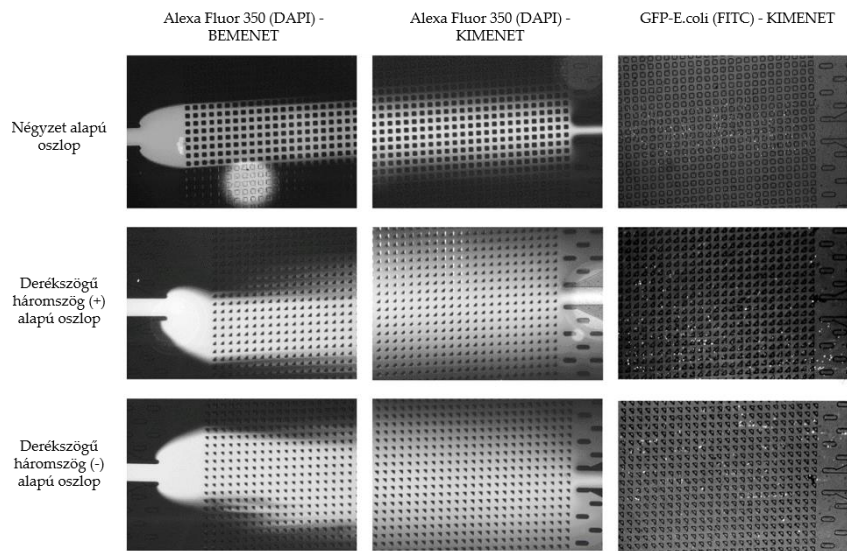
6.1.3 Biológiai minta viselkedése DLD rendszerben

A pálcika alakú *E. coli* baktériumok méretei ($\varnothing = 0,5 / h = 2 \mu\text{m}$) a tervezett mikrofluidikai DLD rendszerre vonatkozó kritikus átmérő érték (D_c) határai alatt vannak, így normál esetben eltérülés nélküli cikk-cakk mozgást kellene végezniük az oszlopok között. Az eltérő oszlopalak megjelenésének célja, hogy azok a sejtorientációt befolyásolva javítsák a szeparálás hatékonyságát, vagy hangolják a rendszer áteresztőképességét. A szimmetrikus négyzetes és az aszimmetrikus derékszögű háromszög alapú (+, -) oszlopokból felépülő rendszereket baktériumok esetén is vizsgáltam, hogy felderítsem, milyen mozgásformát mutatnak a különböző oszlopalakok mellett. A baktériumok érzékenyek a nyíróerőkre, nyák képzésre hajlamosak, ezért ezeknél a méréseknél a támaszfolyadék (PBS) áramlási sebességét csökkentettem $0,9 \mu\text{l/s}$ -ig, míg a fluoreszcens (Alexa Fluor 350 - DAPI) oldatét változatlanul hagytam ($0,2 \mu\text{l/s}$). A 32. ábra -következő oldalon szemlélteti a fluoreszcensen jelölt *E. coli* (GFP - FITC) eltérülésének mértékét az egyes csatornák kimenetein.

Az elvártaknak megfelelően a négyzetes oszlopokat tartalmazó rendszerben a baktériumok fókuszáltan maradtak a fluoreszcens oldatban, míg az aszimmetrikus oszlopok esetén a fluoreszcens oldat térülésével és szélesedésével együtt a baktériumok is követték annak eloszlását.

A vizsgált oszloprendszerek körül a négyzet alapú oszlopokat tartalmazót javasoltam további tesztekre és alkalmazásra. Ezek az oszloprendszerek egy meghatározott szeparációs méretet definiálnak. A résméret ebben az esetben $40 \mu\text{m}$ a vizeletben található alakos elemek jellemző mérete miatt (laphámsejtek, hámsejtek, nyák, spermium, gomba $\varnothing = 7\text{-}60 \mu\text{m}$). Az oszlopok magassága $50 \mu\text{m}$ a jelenlegi formában. A vizsgált rigid gyöngyök ($\varnothing = 16,5$ és $20,4 \mu\text{m}$) már a fluidika elején elszeparálódtak (lásd 29. ábra, 64. oldalon) és az *E. coli* maradt a fókuszában (lásd 32. ábra, 69. oldalon). A szeparációs egység a mikrofluidikai rendszer első eleme lehet a mintaelőkészítés folyamatában, mely során a fókuszált oldatban maradt sejtek további szűrésen eshetnek át akár keresztáramlásos szűréssel, akár laterális fókuszálással. A további mérésekhez éppen ezért már kisebb gyöngyméreteket alkalmaztam a $\varnothing < 16,5 \mu\text{m}$ mérettartományban.

Méréseim során vizsgáltam az oszlopok között kialakuló sebességtér alakulásának hatását a részecskeszeparálás hatékonyságára. A négyzetes oszlopok esetén a soroltolás mértékének az oldalfalak hosszából kifolyólag látszólag nagyobb szerepe van az egyéb geometriájú oszlop rendszerekhez képest, így a felgyorsuló áramlási profillal jobb szeparálási hatások érhető el rigid részecskék esetén (D_c értéke dinamikusan változhat a Reynolds szám növelésével [64]). Azonban ez alapján nem jelenthető ki, hogy ez lenne a legalkalmasabb megoldás valós, deformálható, változatos morfológiájú sejtek esetén, ugyanis az áramlási sebesség emelésével, a nyíróerők hatására jobban deformálódnak az összenyomható sejtek. Az elválasztás sikere az adott részecske két oszlop között felvett maximális laterális kiterjedésétől függ, így a szeparálás az oszlopok közt felvett, esetenként kisebb effektív méret alapján történik. Az oszlopalakban kialakított csúcsok és árkok rásegíthetnek egy adott sejt jellegzetes mozgásformájára [69], így kisebb Reynolds-szám és kisebb lokális áramlási sebesség mellett nem a deformálódás mértéke, hanem az adott sejt mozgásformája lesz a mérvadó, a fluidikában fellépő dugulás veszélye is kisebb lesz.



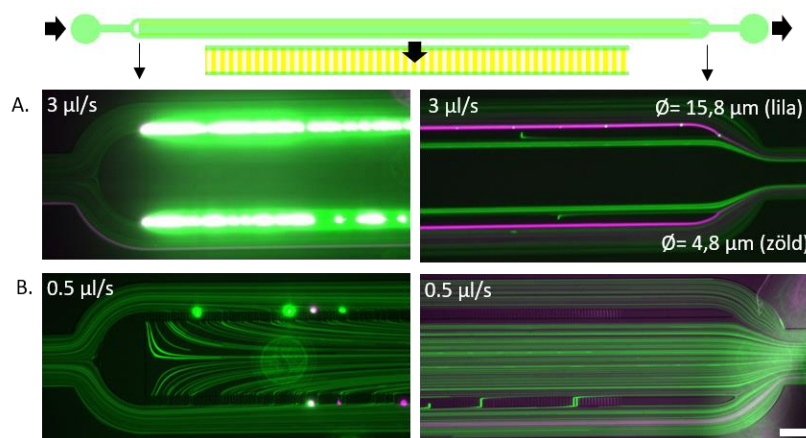
32. ábra: Szimmetrikus, illetve aszimmetrikus oszlopok hatása az GFP-E. coli populáció elmozdulására a fluidikában. A mintaoldatba Alexa Fluor 350 fluorofort kevertem, mely a DAPI fluoreszcens tartományban ad jelet, a GFP-E. coli a FITC fluoreszcens szűrőkonfigurációval detektálható.

6.2 Keresztáramlású szűrés

Az előzőekben bemutatott determinisztikus oldalirányú eltérítést alkalmazó részecskeszűrő mikrofluidikai rendszer limitációit figyelembe véve kezdtem el vizsgálni a keresztáramlásos szűrést kihasználó szerkezetek szűrési hatékonyságát, főképpen biológiai minták esetében. Célom egy változatos összetételű minta, alakos elemeinek baktériumra célzott szűrése, illetve a baktériumok eljuttatása volt a mérési területre. A biológiai minták nyíró erőknek való korlátozott ellenállása miatt alacsony áramlási sebességek mellett szükséges jelentős mennyiségű minta folyamatos kezelése – amire a keresztáramlásos szűrési eszközök adhatják a megoldást. A keresztáramlású érintő szűrési megoldás csökkenti a dugulásra való hajlamot – szemben a dead-end típusú szűrőkkel. A kívánt áteresztőképesség miatt célszerű a fluidikai mérések során olyan magas áramlási sebességet választani, ami megfelelő mintamennyiség kezelését teszi lehetővé elfogadható idő alatt, azonban a szeparálási módszer hatékonyságát még nem veszélyezteti. Vizsgálataim célja a minél hatékonyabb szűrés elérése volt a mintaoldatban megtalálható E. coli baktériumok esetén. A RUBA fejlesztési projekt kapcsán olyan fluidikai eszköz terve körvonalazódott, melynél egy hitelkártya nagyságú területen valósul meg a minta előkészítése, szűrése és a célminta koncentrációja az érzékelési területen.

A keresztáramlásos szűrési mikrofluidikai rendszer 50 és 100 μm magas, párhuzamos mikrofluidikai csatornákat tartalmaz, a közöttük kialakított szűrési zónában pedig 20 μm magas és 10 μm széles pórusokkal (csatornákkal) rendelkezik. Laborkörülmények között üveg és PDMS anyagokból kialakított hibrid mikrofluidikai rendszerekben vizsgáltam a keresztáramlásos szűréses folyamat hatékonyságát fecskendőpumpával hajtott áramlás mellett.

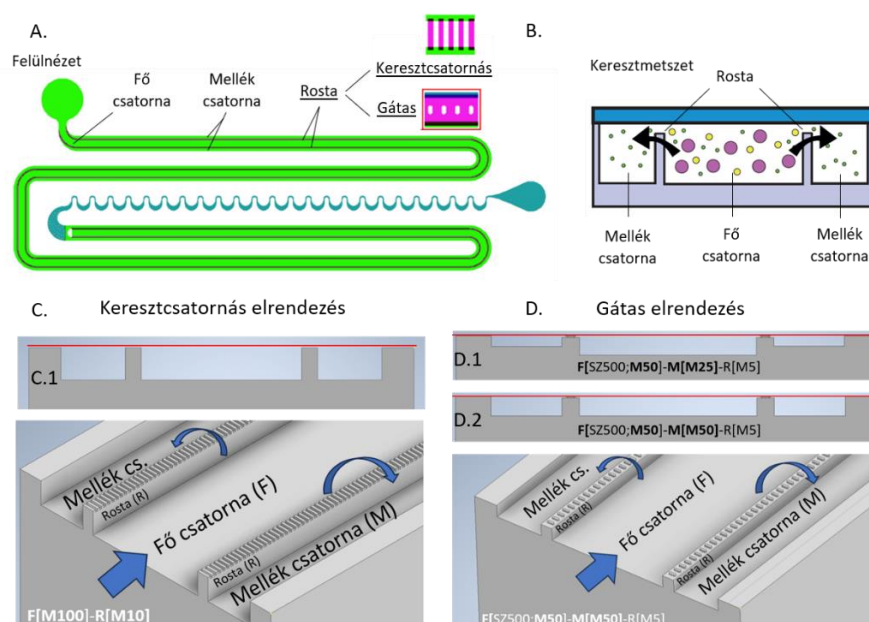
Az első tesztek során alkalmazott mikrofluidikai rendszer vizsgálata esetén a model gyöngyök átmérője 4,8, illetve 15,8 μm volt. Összehasonlítva a 33. ábra képeit, látható, hogy 3 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség esetén a nagyobb gyöngyökből kialakul egy tömörülési réteg a szűrőfelszínen, ami jelentősen befolyásolja a szeparálás hatékonyságát. Alacsonyabb áramlási sebesség tartományban (0,5 $\mu\text{l/s}$) ez a jelenség elhanyagolható, a kisebb gyöngyök átszűrődése már a csatorna elején is megfigyelhető, miközben a 15,8 μm átmérőjű gyöngyök csak érintik a külső szűrőfelszínt vagy annak közelében maradtak.



33. ábra: A keresztáramlásos szűrés folyamatának sebességfüggése 3 (A) és 0,5 (B) $\mu\text{l/s}$ áramlási sebességek mellett, 15,8 μm (lila) és 4,8 μm (zöld) átmérőjű gyöngyök alkalmazásával. Az áramlás iránya balról jobbra, illetve kívülről a szűrőn keresztül a csatorna belsejének irányába történik. A méretskála 200 μm -t jelöl.

Kísérleteim során kétféle szűrőtípust vizsgáltam (34. ábra):

Az első egy „keresztcsatornás” típusú szűrési megoldás, melynél a rosta pórusmérete determinálja a szűrt részecskeméretet: a 10 μm szélességű csatornák a szűrő teljes szélességében átérnek, egymástól 10 μm távolságra elhelyezve – összekötve a bemeneti és kimeneti csatornákat. A szűrés hatékonyságát a szűrő és az áramlási csatornák magasságainak függvényében vizsgáltam. Alkalmazott jelölések: Főcsatorna[Magasság]-Rosta[Magasság], példa: F[M100]-R[M10], ami 100 μm magas bemeneti csatornára és 10 μm magas szűrőpórusra utal.



34. ábra: Keresztáramlásos (CF) szűrőrendszerek sematikus ábrája (A), és keresztmetszeti képe (B). A keresztcsatornás (C) és a gát típusú (D) szűrő szerkezete.

A másik megoldás egy „gát” típusú elrendezés, ahol a szűrőrés nagysága a korlátozó tényező. Ennél a szerkezetnél nagyobb felületen történik a szűrés. Egy hagyományos „gát” típusú szűrőben nincsenek oszlopok, de a mi esetünkben erre a PDMS elasztikussága miatt szükség volt, elkerülendő a fluidikai csatornák letapadását és elzáródását. Ha a mikrofluidikai rendszer a későbbiekben rigid anyagból készül, például hőre lágyuló polimerekből – PC, COC, COP stb. – akkor ezeket az oszlopokat el lehet hagyni. Az oszlopok ebben az esetben nem érnek át a szűrő teljes keresztmetszetén, mindössze 20 μm hosszúak, és egymástól 20 μm távolságra elhelyezkednek el. Négyféle geometriát alakítottam ki és vizsgáltam (lásd 7. táblázat). A bemeneti főcsatorna 50 μm -es magassága mellett annak szélességét változtattam 500 μm és 300 μm között – F[Sz500M50] és F[Sz300M50]. A kimeneti mellékcsatorna magasságait 50 μm -re vagy 25 μm -re választottam – M[M50] és M[M25]. A szűrőrés magasságát változatlanul 5 μm -re állítottam be – R[M5] – támasztó oszlopokat alkalmazva. Ezek a struktúrák felületkezelés és gyártástechnológiai szempontból is előnyösebbnek bizonyultak az előzőeknél. Ezek alapján a vizsgált négy különböző struktúra:

Típus	Keresztcsatornás szűrőrendszer	Gát szerkezetű szűrőstruktúra
1.	F[M100]-R[M10]	F[Sz500M50]-M[M50]-R[M5]
2.	F[M50]-R[M10]	F[Sz500;M50]-M[M25]-R[M5]
3.	F[M50]-R[M5]	F[Sz300;M50]-M[M50]-R[M5]
4.	F[M25]-R[M5]	F[Sz300;M50]-M[M25]-R[M5]
Jelölés	Főcsatorna[Magasság]-Rosta[Magasság]	Főcsatorna[Szélessége; Magassága] - Mellécsatorna[Magassága] - Rosta[Magassága]

7. táblázat A szűrési megoldások típusai és az elrendezéshez használt paraméterek definiálása típusonként megfelelő jelöléssel.

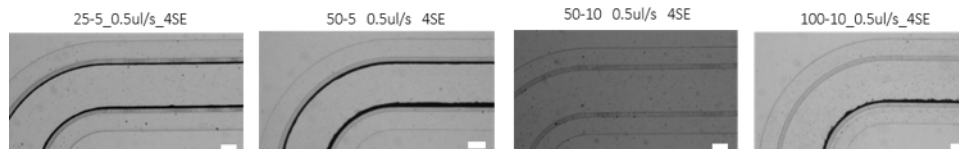
A szűrés hatékonyságának ellenőrzéséhez a szürendő kiindulási oldat, és a szűrlet összetételét hasonlítottam össze LUNA automata optikai sejtszámláló vagy mikroszkóp alatt elemzett C-Chip (DHC-N01) Bürker-kamrák segítségével. A LUNA sejtszámláló mérési tartománya $5 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ sejt/ml, a detektálható átmérőtartomány 90 - 3 μm , így a szűrletben a baktériumoknak megfelelően célmintakonzentrációt manuális számolással kellett ellenőriznem. A méréseimhez $\varnothing=15,8 \mu\text{m}$ (DAPI), $6,08 \mu\text{m}$ (Cy3) és $1,97 \mu\text{m}$ (DAPI) átmérőjű fluoreszcens polisztirol gyöngyöket, illetve pálcika alakú GFP termelő E. coli baktériumokat használtam.

6.2.1 Keresztcsatornás szűrés eredményei

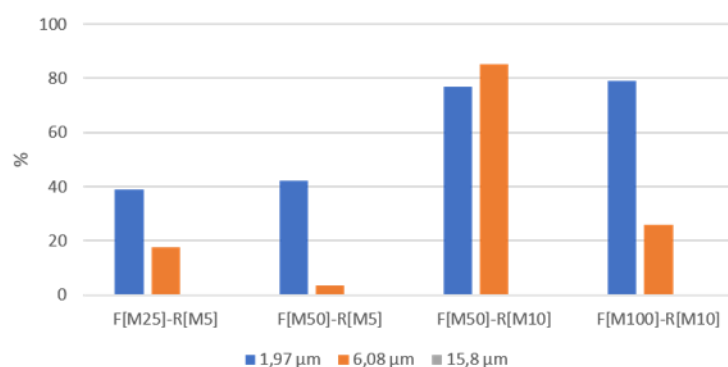
A keresztirányú csatornákból kialakított szűrőt tartalmazó mikrofluidikai rendszerben, $0,5 \mu\text{l/s}$ áramlási sebesség mellett vizsgáltam a szűrés hatékonyságát a fentebb bemutatott modellrészecske szuszpenzióban. A mérés idő körülbelül 25 perc volt, ami az 36. ábra táblázatában látható (0,65 – 0,8 ml) mennyiségű oldat átszűrését jelenti. A mérések során kimutattam, hogy minél kisebb pórusátmérő – magasabb áramlási sebesség és nyomásesés mellett történik a szűrés, annál több célsejtet – $1,97 \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngyöt – veszünk, viszont ezzel párhuzamosan, szintén kevesebb $6,08 \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngy jut át a szűrletbe. Nagyobb áramlási sebességek, és ennek megfelelő nyomásesések mellett több $4,8$ és $6,08 \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngy jutott át a réseken, melyeket azonban szintén szűrni szeretnék. A szűrési folyamat során a legnagyobb gyöngyök egy **tömörülési réteget** alakítanak ki a szűrő felületén, ami akadályozza a célminta átjutását, vagy megakadtak a szűrőcsatornában, csapdázva maguk mögött a célgyöngyöket.

A vizsgált rosták mindegyike kiszűrte a $15,8 \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngyöket (lásd 35. ábra) F[M50]-R[M10]-es fluidika esetén a $6,08 \mu\text{m}$ –es gyöngyök többsége ($> 80\%$) átjutott a szűrőn; a F[M25]-R[M5]-ös és F[M50]-R[M5] fluidikák esetén természetesen a $6,08 \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngyök szűrőn való fennakadása csökkentette a célminta ($\varnothing 1,97 \mu\text{m}$) mennyiségét is a szűrletben. Míg a F[M50]-R[M10] szűrőcsatornával rendelkező mikrofluidikában a célminta körülbelül 23% -a; addig a F[M25]-R[M5]-os fluidikában már a 61% -a is elveszett. A legelőnyösebb geometriák a szűrési hatékonyság alapján a **10:1 főcsatorna magasság: szűrőcsatorna magasság aránnyal rendelkező F[M50]-R[M5] és F[M100]-R[M10] jelű mikrofluidikai rendszerek voltak.**

Ø	1,97 µm	6,08 µm	15,8 µm	
Bemeneti gyöngykoncentráció/ml	2,08E+07	5,50E+05	2,07E+04	
Szűrletben %-os jelenlét	Átlag (%)			Átlagos mintamennyiség (ml)
Ø	1,97 µm	6,08 µm	15,8 µm	
F[M25]-R[M5]	39,09	17,65	0,00	0,65
F[M50]-R[M5]	42,23	3,70	0,00	0,75
F[M50]-R[M10]	76,82	85,29	0,00	0,65
F[M100]-R[M10]	79,22	25,93	0,00	0,80



Keresztcsatornás szűrés



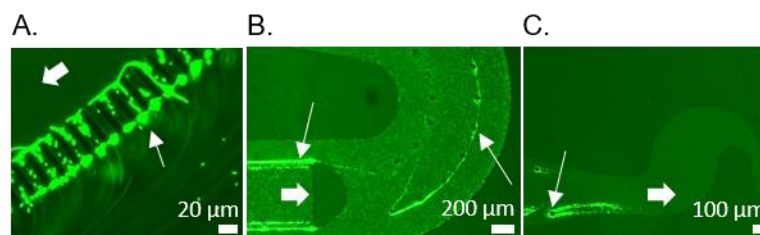
35. ábra: Keresztcsatornás szűrés hatékonyságának vizsgálata, valamint a szűrőfelület utolsó szakaszában -4. sor eleje (4SE) kialakuló tömörülési réteg a szűrőfelszínen

Ugyanebben az elrendezésben F[M50]-R[M5] csatornában 5 µm szűrő magasság mellett teszteltem GFP-E. coli baktérium viselkedését (37. ábra), valamint a baktériumok és a 15,8 µm átmérőjű gyöngyök oldatának szűrését. Az E. coli-t $8,5 \times 10^7$ sejt/ml koncentráció mellett. Ebben az esetben 0,5 µl/s áramlási sebesség mellett 18 percig áramoltattam a baktériumok és gyöngyök szuszpenzióját, és körülbelül 0,4 ml szűrlet összetételét vizsgáltam meg. A Bürker-kamrában történő elemzések szerint a baktériumok 83,5%-át visszakaptuk a szűrletből, viszont jelentős baktérium kitapadást tapasztaltunk a teljes szűrőfelületen. Feltehetőleg a fellépő nyíróerőkre adott sejtválasz következtében nyákcsomók képződtek az oszlopok szélein.

Baktériumok sejtfala merev peptidoglikánokból áll, melyek rövid peptidláncokkal keresztkötött lineáris szénhidrátláncokból épülnek fel. E. coli esetén a peptid oldalláncok 50%-a nem kapcsolódik sehova, másik felük csak egy irányba köt. A Gram-negatív baktériumok sejtfalában a peptidoglikán réteg meglehetősen vékonyabb (1,5–2 nm), és a külső felületen is található egy, a belső citoplazmamembránhoz hasonlító membrán. Sejtfalukban több a lipid jellegű anyag (15-20%) [88]. A kezdeti reverzibilis kitapadásokat elsősorban a Lewis-féle sav-bázis kölcsönhatásokat, az elektrosztatikus valamint a hidrofób van der Waals kölcsönhatásokat teszik felelőssé; valamint azt a tényt, hogy a sejtfalban levő foszfát- és karbocsil csoportok negatív töltést kölcsönözve a sejtnak elektron - donor funkciót látnak el. [162]

A szakirodalomban kimutatták, hogy turbulens körülmények között a biofilm formálódása során fonalas struktúrák (streamerek) képződhetnek, de ez akár alacsony Reynolds-szám ($Re < 1$)

esetén is megtörténhet, és akár 1 mm hosszúak is lehetnek, nagy nyomás vagy nagy nyírófeszültség esetén megnyúlhatnak és viszkoelasztikus polimerként viselkedhetnek. [163] A jelenség az oszlopos struktúráink esetén is megfigyelhető volt, ennek kiküszöbölése érdekében elengedhetetlen alacsonyabb áramlási sebességtartományra korlátozni a méréseket, vagy – mi utóbbi mellett döntöttünk – a mikrofluidika geometriáját megváltoztatni.



36. ábra: F[M50]-R[M5] integrált mikrofluidikában végzett szűrési teszt eredménye *E. coli* célminta esetén, 0,5 µl/s áramlási sebesség mellett. A vastag fehér nyíl az áramlás irányát jelöli, a vékonyabb nyilak a fluidikában kialakuló *E. coli* csomókat a szűrőfelszínen (A), a szűrő végén (B) és a laterális fókuszáló egység elején található oszlopokon (C).

A keresztcsatornákat tartalmazó szűrő esetén, azok eldugulása is számos esetben volt tapasztalható. Ez a jelenség különösen akkor volt szembetűnő, ha a szűrőcsatorna keresztmetszetéhez hasonló átmérőjű gyöngyöket használtam a gyöngykeverékben. A chipék feltöltése során további problémát okozott a PDMS csatornafalak hidrofób jellege, ami miatt buborék gát keletkezhet a pórusokban, ezzel akadályozva a célrészecskék átjutását. Az oxigén plazmával segített PDMS-üveg bondolás után pár óra elteltével a PDMS elveszti ideiglenes hidrofil jellegét, ami megnehezíti a kazetták mintával való feltöltését. A PDMS oszlopok emellett korlátozzák a teljes szűrési felületet, amire egy lehetséges megoldást adhat a későbbiekben bevezetett duzzasztógát típusú rostarendszer, ahol csak magassági korlátozása van a szűrőrésnek. A felületükön kiülő nagyobb gyöngyök ugyan emelik a szűrő ellenállását, de nem akadályozzák meg teljesen a kisebb baktériumok átjutását, ahogyan azt a későbbiekben bemutatom.

Összefoglalva tehát, a legelőnyösebb geometriák a szűrési hatékonyság alapján a **10:1 főcsatorna magasság : szűrőcsatorna magasság aránnyal rendelkező F[M50]-R[M5] és F[M100]-R[M10] jelű mikrofluidikai rendszerek** voltak, melyből a **F[M50]-R[M5] arányokkal terveztem tovább dolgozni az újabb geometriák esetén**. A keresztirányú szűrőcsatornákat tartalmazó megoldás hátrányai: a nagyobb csatorna ellenállás, pórusok elégtelen feltöltődése inhomogén felületkezelés esetén, illetve a komplikáltabb technológiai megvalósíthatóság.

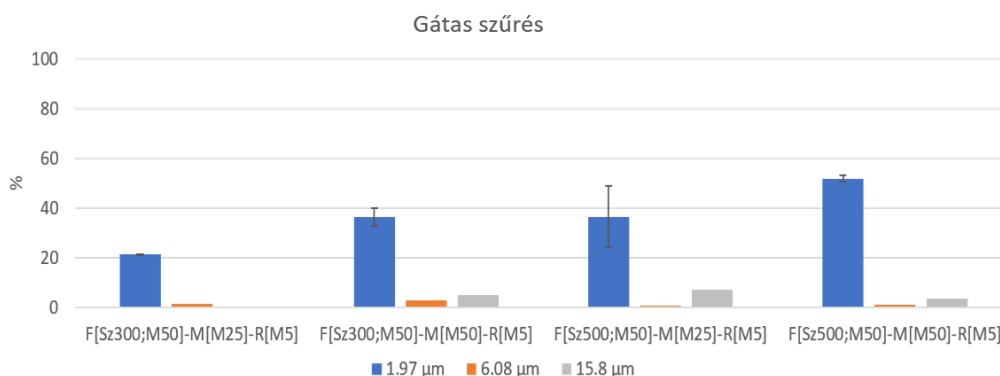
A vizeletben a laphámsejteken, cilindereken, kristályokon, gombán kívül, többféle komponens is előfordulhat: változatos alak és mérettartomány (1 – 60 µm átmérő) jellemzi az összetételt. Az 5 µm magas keresztirányú szűrőknél baktériumokon kívül (ezek mérete 1-2 µm), előre láthatóan a vörösvértestek (2-8 µm) is át tudnak jutni a szűrőn, figyelembevéve deformálhatóságukat – ennek megfelelően a szűrés után még szükséges egy méret szerinti szétválasztás, amit a laterális fókuszáló egységben terveztem megoldani.

6.2.2 Gát típusú elrendezés eredményei

A duzzasztógát típusú elrendezésben a szűrőrés méretét 5 μm -re terveztem, a keresztcsatornák hiánya miatt, így is jelentősen kisebb hidrodinamikai ellenállás volt tapasztalható, mint az oszlopos elrendezésben. A mikrofluidikai rendszerek tesztelését, mindegyik esetben 0,5 $\mu\text{l/s}$ -os áramlási sebesség mellett végeztem, az átszűrt mintamennyiség 100 – 120 μl volt, hozzávetőlegesen 30 perces szűrési idő mellett. A szűrlet összetétele mellett a fluidika teljes hosszában vizsgáltam a szűrőfelszínt.

A kísérleti eredmények összefoglalása az 37. ábrán látható, a szűrletben kialakuló koncentrációkat a bemeneti értékekhez viszonyítva, 15,8 – 6,08 – 1,97 μm átmérőjű gyöngyök esetén. A célminta jelenlétét figyelembe véve, a legjobb eredményeket az F[Sz500;M50]-M[M50]-R[M5] struktúra szolgáltatta, ahol a főcsatorna és a mellékcsatorna is azonos magasságú volt (50 μm) és a főcsatorna a legnagyobb keresztmetszettel rendelkezett (500 μm). Azonos bemeneti koncentrációk mellett itt körülbelül 52 %-ban volt jelen a célminta a szűrletben. A legrosszabb szűrési ráta a 300 μm széles csatornában volt tapasztalható, sekélyebb mellékcsatorna mellett (F[Sz300;M50]-M[M25]-R[M5]). Ez utóbbi esetben a célminta jelenléte a szűrletben 21 %-ra esett vissza; melynek fő oka a szűrő felszínének jelentős eltömődése volt.

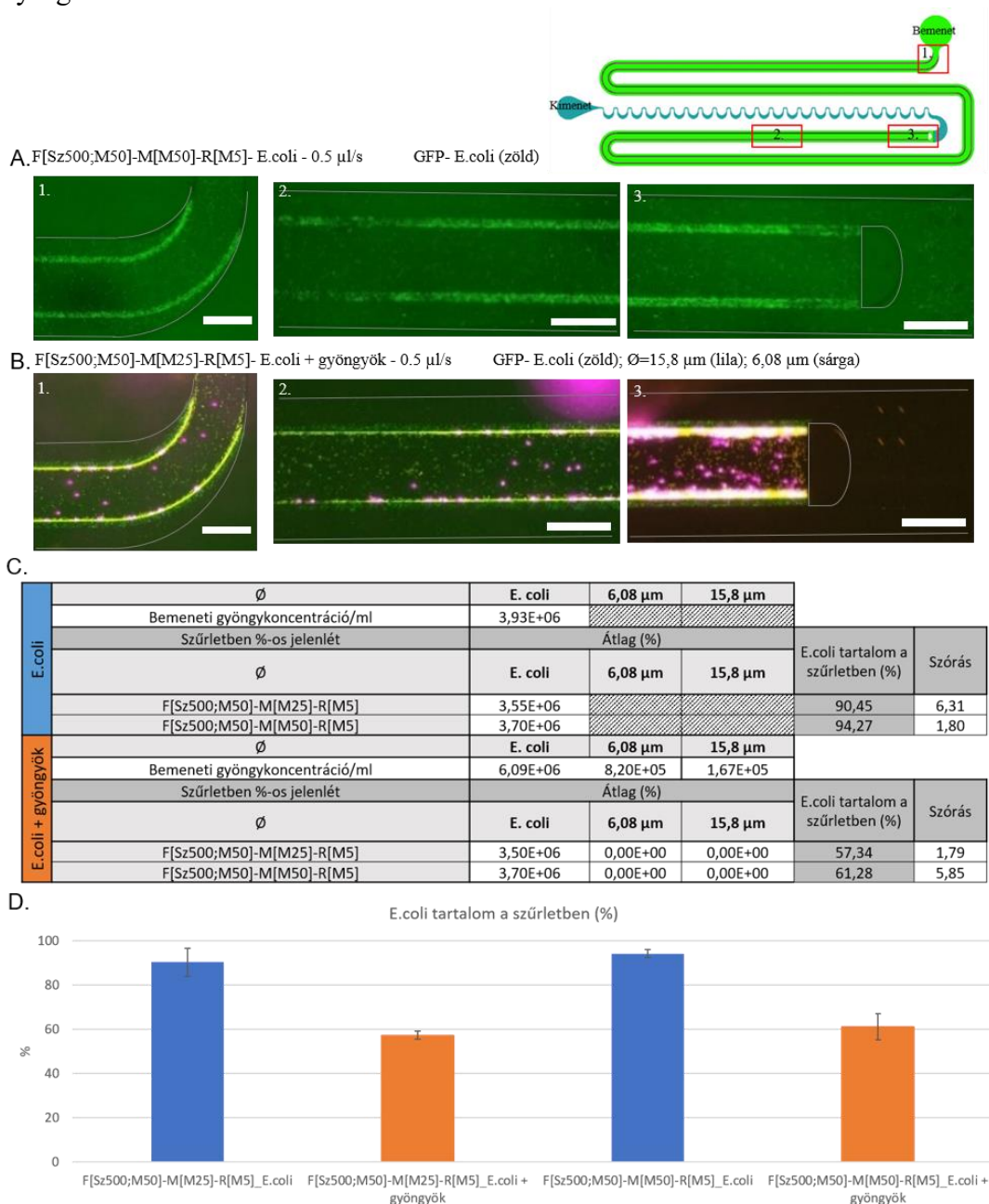
\emptyset	1,97 μm	6,08 μm	15,8 μm		
Bemeneti gyöngykoncentráció/ml	2,28E+05	6,19E+05	2,07E+05		
Szűrletben %-os jelenlét	Átlag (%)			Szórás	Átlagos
\emptyset	1,97 μm	6,08 μm	15,8 μm	(1,97 μm)	mintamennyiség (μl)
F[Sz300;M50]-M[M25]-R[M5]	21,44	1,56	0,00	0,15	107,50
F[Sz300;M50]-M[M50]-R[M5]	36,61	2,82	5,13	3,60	103,33
F[Sz500;M50]-M[M25]-R[M5]	36,71	0,85	7,33	12,20	115,00
F[Sz500;M50]-M[M50]-R[M5]	51,99	1,28	3,57	1,31	112,50



37. ábra: Gát típusú szűrés, 0,5 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség mellett, 4 féle struktúrában különböző gyöngyméretekkel.

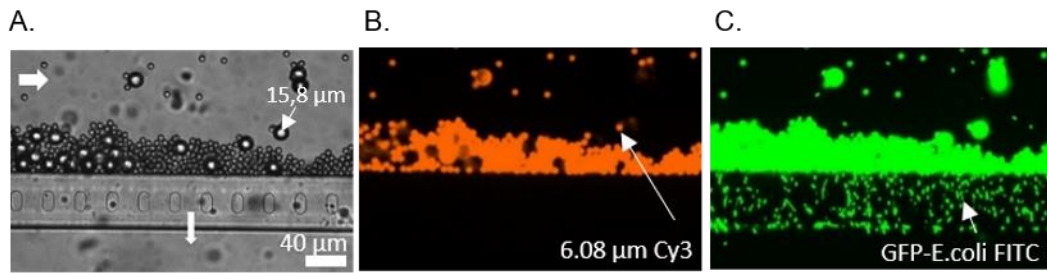
A legjobban teljesítő F[Sz500;M50]-M[M50]-R[M5] mikrofluidikai rendszerben GFP-E. coli jelenlétében is végeztem szűrési kísérleteket. Összehasonlításként az alacsonyabb mellékcsatornával rendelkező F[Sz500;M50]-M[M25]-R[M5] szerkezeteket is vizsgáltam. A vizsgálatok során elemeztem a szűrendő alakos elemek kitapadásának mértékét, valamint a korábbi gyöngy keverékben ($\emptyset = 15,8 - 6,08 - 1,97 \mu\text{m}$) a legkisebb gyöngyöt E. coli cserélve is ellenőriztem a szűrés hatékonyságát. $3,9 \times 10^6$ db/ml koncentrációjú E. coli szuszpenziót áramoltatva a mikrofluidikai rendszerekben, a célminta a bemeneti koncentrációhoz viszonyítva 90 %-ban és 94%-ban volt fellelhető volt a szűrletben a 25 μm és az 50 μm magas oldalcsatornákkal rendelkező geometriákban. Megjegyzendő, hogy a mérések szórása miatt ez nem tekinthető

szignifikáns különbségnek. A kísérleteket megismételtem nagyobb gyöngyök hozzáadásával is (38. ábra), feltüntetett bemeneti koncentrációkkal). Ebben az esetben a célminta koncentrációja lecsökkent a szűrletben 57 - 61 %-ra. A fluoreszcens felvételek (39. ábra) tanulsága szerint a szűrő felszínre kiült gyöngyök alkotta tömörülési réteg szintén kiegészítő szűrőfelületként szolgált az E. coli számára, ami bizonyítja, hogy a minta összetétele jelentősen befolyásolja a szűrés hatékonyságát.



38. ábra: Duzasztógát típusú szűrőelrendezés szűrési hatékonyságának vizsgálata 0.5 µl/s áramlási sebesség mellett. Sematikus ábrán látható módon a csatorna elején és végén tapasztalt szűrő szennyeződés csak E. coli jelenlétében (A), illetve E. coli és fluoreszcens gyöngyök keveréke esetén (B), valamint a szűrési hatékonyság összehasonlítása (C-D). A méretskála az ábrán 500 µm-t jelöl.

A méréseket ismétlése termoplasztikus: COP vagy COC anyagú fluidikákban pontosabb képet adhatna arról, milyen mértékben rontja a szűrés hatékonyságát a PDMS deformálhatósága.



39. ábra: A keresztáramlásos mikroszűrős mikrofluidikai rendszerben kialakuló tömörülési réteg jelentősen befolyásolja a szeparációs hatásfokot –Mikroszkópos kép: szűrési réteg kialakulása a szűrő felületén (A); különböző méretű modell gyöngyök jelenlétében: 15,8 μm (A), 6,08 μm (B – narancssárga), E. coli baktérium (C – zöld).

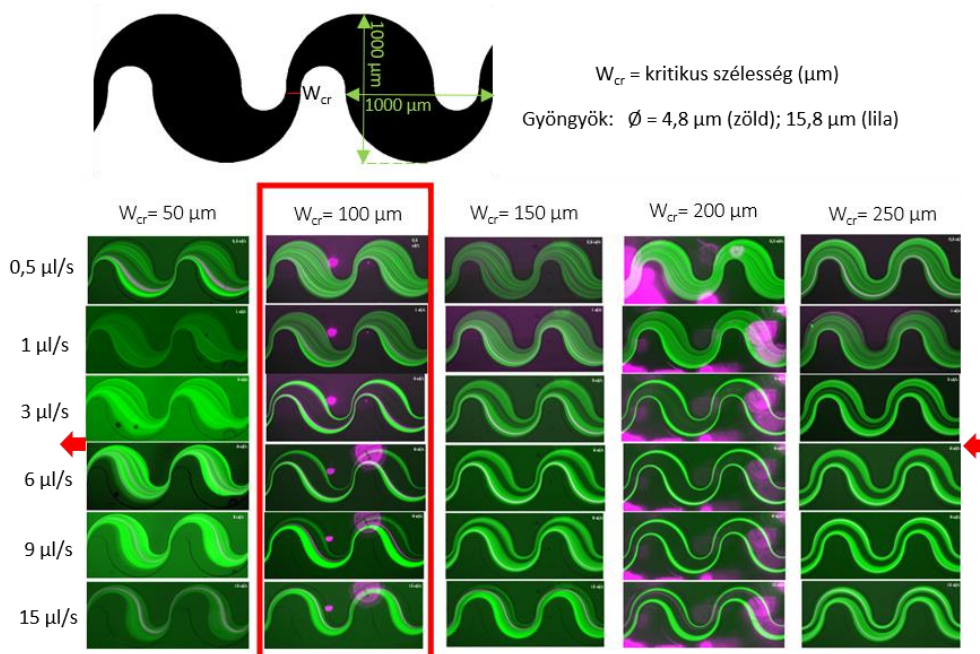
Összefoglalva tehát, a legelőnyösebb geometriák a szűrési hatékonyság alapján a szélesebb (500 μm főcsatornával rendelkező) fluidikák voltak: **F[Sz500;M50]-M[M50]-R[M5]** és **F[Sz500;M50]-M[M25]-R[M5]**, melyekben a szűrés hatékonyságban nem volt szignifikáns eltérés, azonban E.coli vs. E.coli + \emptyset 15,8 és 6,08 μm gyöngyök keverékének szűrésénél egyértelművé vált, hogy a rendszer kritikusan érzékeny a minta összetételére. Az újabb geometriai elrendezésben nem tapasztaltunk olyan mértékű nyákképződést, mint ami a keresztcsatornás szűrő esetén.

6.3 Laterális fókuszálás

A mikrofluidikai laterális fókuszáláson alapuló részecskeszeparációs módszer alkalmazásának legnagyobb kihívása a fluidikai csatornában a különböző méretű gyöngyökre ható tehetetlenségi erők és a Dean örvények indukálta húzóerők optimalizálása. A nagyobb részecskék hamarabb megtalálják az egyensúlyi pozíciójukat, azonban a kisebb részecskék laterális migrációja lassabban történik meg, mint ahogy azok végig érnek a csatorna teljes hosszán. Laterális migráció elősegítésére megoldás lehet a (1) a csatorna keresztmetszet csökkentése – ez ugyanakkor az áteresztő képesség romlásával jár; (2) az áramlási sebesség növelése, amivel a Dean örvények keltette húzóerő válhat dominánssá. Ez egy határig segíti a fókuszálást ($De < 20$), de azon túl már a keveredést segíti elő. További megoldás (3) a csatorna hosszának növelése, azonban Point-of-Care Lab-on-a-Chip (PoC LoC) eszközök esetében a kazetta mérete nem növelhető tetszőlegesen, figyelembe véve felhasználhatóságot és költséget is, így a kompakt forma előnyösebb. Az általam tervezett hullámcsatorna minden esetben 3 cm hosszú volt, 23 kanyarulatból állt és a gyöngyök pozícióját a teljes csatorna végén vizsgáltam. A hosszúság növelésének hatásaira végecsellem COMSOL szimulációkkal adtunk választ.

6.3.1 Szimmetrikus, periodikusan változó keresztmetszetű mikrofluidikai csatornák

Kísérleteim során először a geometria és az alkalmazott áramlási sebesség optimalizálását végeztem el. Kezdetben szimmetrikus kanyarulatokkal rendelkező mikrofluidikai csatornában $4,8 \mu\text{m}$ (FITC) illetve $15,8 \mu\text{m}$ (DAPI) átmérőjű gyöngyök laterális pozícióját vizsgáltam. Az $50 \mu\text{m}$ magas (jelölés: H) fluidikákban a kritikus szélességet – a csatorna legkeskenyebb szakaszát (jelölés: W_{cr}) – $50, 100, 150, 200, 250 \mu\text{m}$ -re választottam. A kísérletek során $0,5 - 15 \mu\text{l/s}$ áramlási sebességet állítottam be. A részecskék pályavonalait fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltam, ahogy az a 40. ábrán látható. A nagyobb gyöngyök fókuszálódása alacsony áramlási sebességek esetén is megtörtént, de pályavonaluk nem különültek el a kisebb gyöngyöktől. Az áramlási sebesség emelésével a nagyobb gyöngyök lokális pozíciója számottevően változott, és a $4,8 \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngyök koncentrációja is megtörtént. A szimmetrikus elrendezésű fluidikában, minden mérésnél azonos tendencia figyelhető meg: a kisebb gyöngyök az áramlási sebesség emelésével fokozatosan migrálnak a csatorna széleihez, miközben kialakul egy kiürülési sáv a csatorna közepén ($W_{cr} = 100 \mu\text{m}$; $3 \mu\text{l/s}$). A csatorna görbületéből adódóan – áramlási irány a képeken jobbról balra – a két fókuszált sáv a sebesség emelésével tolódik a csatorna középpontja felé, és ezzel párhuzamosan romlik a fókuszáltsága ($W_{cr} = 100 \mu\text{m}$; $9 \mu\text{l/s}$), míg végül egyetlen sávban ($W_{cr} = 100 \mu\text{m}$; $15 \mu\text{l/s}$), koncentráltan lép ki a mikrofluidikai egységből. A csatorna kritikus szélességének növelésével a kisebb gyöngyök laterális migrációja hasonló karakterisztikát mutat, azonban csak magasabb áramlási sebességgel kényszeríthető ki a koncentrációjuk.



40. ábra: Szimmetrikus laterális fókuszáló egység sematikus ábrája és a különböző méretű gyöngyök laterális pályavonalainak mintázata változó W_{cr} értékek és áramlási sebességek (0,5 – 15 $\mu\text{l/s}$) mellett vizsgálva. A piros nyíl a képen az áramlási irányt jelöli.

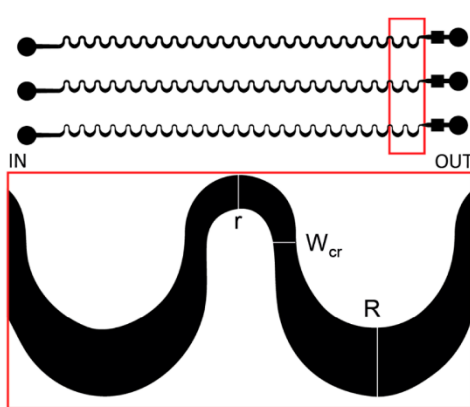
Megjegyzés: a képen látható nagyobb lila foltok műtermékek, azok a 15,8 μm átmérőjű fluoreszcens gyöngyök felvételeiről származnak, a fluidikai csatorna alatt vagy felett, DAPI hullámhosszon szintén jelet adó szennyeződések, melyek a mérést nem befolyásolták, de a felvételek minőségét kissé rontották.

Az ábrán látható első geometria ($W_{cr} = 50 \mu\text{m}$) több okból sem szerencsés: (1) a nagy áramlási sebességek keltette nyíróerők károsíthatják az élősejteket, (2) az integrált fluidikai egységben az egymást követő fluidikai elemekben kialakuló áramlási sebességeknek összhangban kell lennie, ily módon az alacsonyabb áramlási sebességekkel működtetett keresztirányú szűrő után például korlátozottan építhető be magas sebességű laterális fókuszáló egység. Olyan geometria vált tehát szükségessé, ahol (1) egyetlen pontba történik meg a laterális fókuszálás, (2) moderált áramlási sebességek mellett is megbízhatóan működik, (3) és az áramlási sebesség emelésével sem változik drasztikusan az egyes részecskeméretrehoz tartozó egyensúlyi pozíció.

6.3.2 Aszimmetrikus, periodikusan változó keresztmetszetű mikrofluidikai csatornák

Az aszimmetrikus, periodikusan változó keresztmetszetű mikrofluidikai csatorna tervezéséhez Dino di Carlo tanulmányát vettem alapul. Megtartottam a 3 cm-es csatornahosszt, azonban a kritikus keresztmetszet $W_{cr} = 50-100-150 \mu\text{m}$, a csatorna magasság pedig $H = 25-50-100 \mu\text{m}$ között változott. A periodikusan ismétlődő, aszimmetrikus szerpentin csatorna 23 kanyarulatot tartalmazott szűkebb és szélesebb kanyarulatokkal (lásd 41. ábra). A tervezett fluidika az alábbi paraméterekkel rendelkezett:

- a kis kanyarulat szélessége minden esetben $50 \mu\text{m}$ -nal nagyobb, mint a legszűkebb, kritikus keresztmetszet szélessége (W_{cr}),
- a nagy kanyarulat szélessége $300 \mu\text{m}$, melyben az egyes gyöngyméreték fókuszálási pozícióját azonosítottam.



Indexelés

H100_Wcr150	-	H100_Wcr100	-	H100_Wcr50
H 50_Wcr150	-	H 50_Wcr100	-	H 50_Wcr50
H 25_Wcr150	-	H 25_Wcr100	-	H 25_Wcr50

Jelölés

H	= csatorna magasság (μm)
W _{cr}	= kritikus szélesség (μm)
r	= kis kanyarulat = $W_{cr} + 50 \mu\text{m}$
R	= nagy kanyarulat = $300 \mu\text{m}$

41. ábra: A mikrofluidikai csatorna alapelemének sematikus szerkezete

A fókuszálás hatékonyságát a különböző méretű gyöngyök pályavonalainak laterális pozíciójával, vagyis az általuk adott fluoreszcens intenzitásprofil maximumával és szélességével jellemeztem a csatorna utolsó (23.), $300 \mu\text{m}$ széles kanyarulatában. A fókuszálási folyamat abban az esetben hatékonyabb, ha az intenzitásfüggvénynek jellegzetes éles csúcsai vannak, amelyek a fókusz-pozíciót jelzik a mikroszatornákban. Célom a fókuszálási folyamat tanulmányozása volt a tervezett geometriákban, a tipikus sejtméret régiókban gömb alakú fluoreszcens polisztirol gyöngyöket referenciaként használva.

Dino di Carlo fókuszálási kritériumát figyelembe véve számításba vettem a részecskeméret (a) hidrodinamikai átmérőhöz (D_h) viszonyított arányát, mely kritikus értéke $a / D_h > 0,07$ felett a fókuszálás várhatóan lehetséges. A kialakuló jelenségeket intenzív geometriai parametrizálás során tanulmányoztam változatos csatorna keresztmetszetek mellett, $4,8 \mu\text{m}$, illetve $15,8 \mu\text{m}$ átmérőjű fluoreszcens gyöngyök példája esetén.

6.3.3 Részecskék viselkedésének vizsgálata végelem szimulációval

A hidrodinamikai folyamatok elemzéséhez és magyarázatához a COMSOL Multiphysics szoftver felhasználásával végzett végelem szimulációk nyújtottak segítséget, amelyek alkalmasak a sebességtér és a részecskemozgás analízisére is. Alacsony Reynolds szám esetén, lamináris áramlás feltételei mellett végelem módszerrel (FEM) történt a Navier -Stokes egyenlet megoldása. A meghatározott határfeltételek a következők: a bemeneten lamináris beáramlás 0,5 – 6 $\mu\text{L/s}$ tömegáramlási sebesség között; a kimeneten nulla ellennyomás, tiltott visszaáramlással; a falakon „megcsúszás mentes” („no slip”) határfeltétel. A médium paraméterei: szobahőmérsékleten a vízzel egyező 1000 kg/m^3 sűrűsége; $10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ kinematikai viszkozitás. A maximális, sejtekre, illetve részecskékre vonatkozó Reynolds szám értéke 0,02 – 0,7 között mozgott minden esetben, a térfogatátlag sejt Reynolds szám értéke 0,002-0,08.

A bemenet felületéről 5000 gömb alakú részecskét indítottam két különböző mérettel, homogénnek tekinthető felületi eloszlással. A definiált feltételek szerint a csatornafalat elérő részecskék kitapadtak, míg a kimeneten az elért pozícióban kerültek megállításra. A modellezett részecskék paraméterei a kísérletek során használt fluoreszcens gyöngyök tulajdonságainak megfelelően kerültek beállításra: sűrűségük 1055 kg/m^3 , átmérőjük $4,8 \mu\text{m}$ illetve $15,8 \mu\text{m}$. A struktúra periodikusságát kihasználva a 3D modellt mindösszesen 2 hullámszakaszból építettem fel, és periodikus határfeltétel folyamatos alkalmazásával, a részecskék kimeneti pozíciójának és sebesség paramétereinek megtartásával kerültek áthelyezésre újra a bemenetre. Így tetszőleges periódus számot meghatározva a teljes csatornahosszra nyerhetünk adatokat. Tetraédes háló alkalmazásával a 3D modellben a szimulációs tér körülbelül 16×10^6 elemből állt.

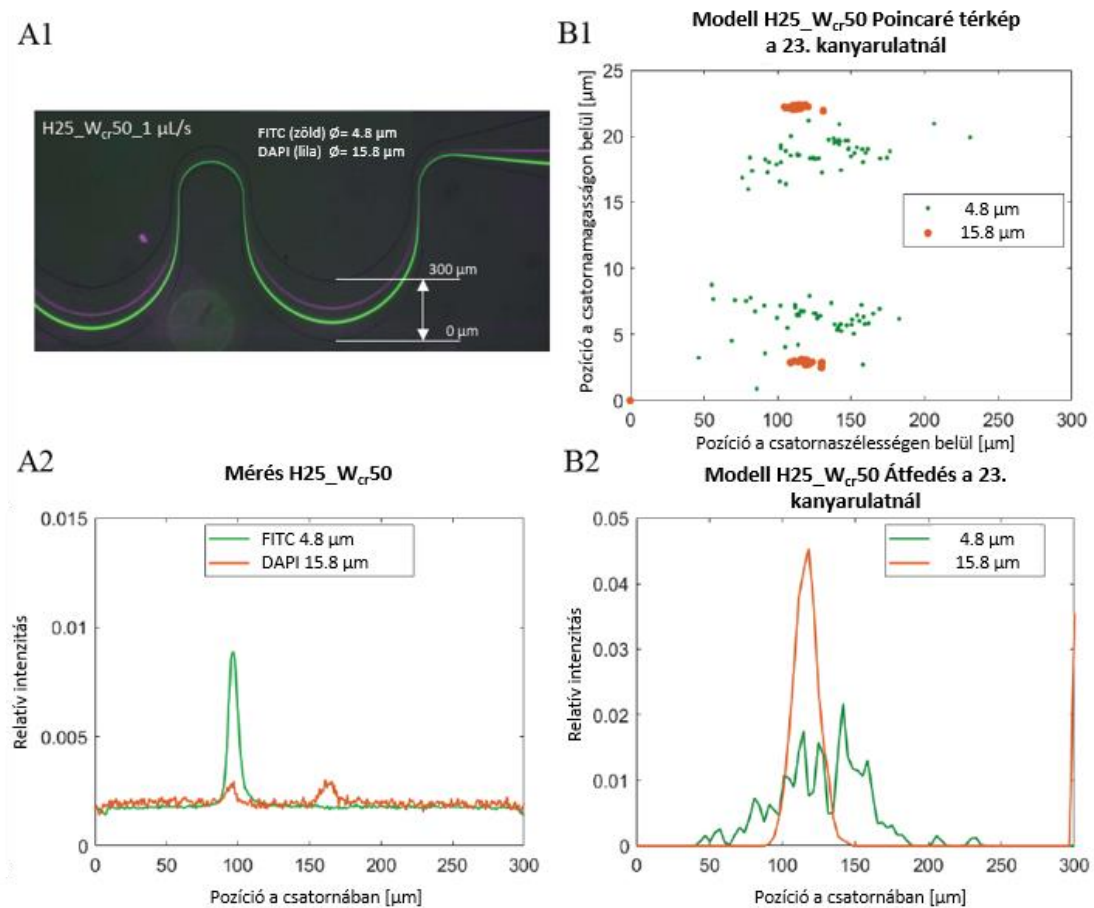
6.3.4 Kísérleti adatok feldolgozása és összevetése a szimulációs eredményekkel

A kísérleti adatok gyűjtése fluoreszcens mikroszkópos felvételek alapján történt. A részecske pályavonalakat hosszú expozíciós idővel készült képeken rögzítettem, a mikrofluidikai csatornában kialakuló eloszlás vizsgálatához az intenzitásprofilok feldolgozását az ImageJ szoftverrel végeztem. A kísérleti és szimulációs adatok eredményeinek összehasonlítására a normált laterális (a folyadék áramlási irányára merőleges y koordináta menti) részecskeeloszlást használtam, amit az intenzitás adatokból lehet származtatni az adott csatornakeresztmetszeti síkban. A relatív fluoreszcens intenzitás eloszlás számítása a periodikus mikrofluidikai csatorna utolsó széles kanyarulatában felvett intenzitásprofil transzformálásával történt. A mikrocsatornák minimális magasságának köszönhetően, lineáris összefüggést feltételeztünk a részecskeeloszlás és a rögzített fluoreszcens intenzitás között – elhanyagolva az esetleges intenzitáselnyomást. A kísérleti és a modellezett eredmények összehasonlíthatóságának érdekében, a csatornakeresztmetszetre vonatkoztatott (intenzitás- vagy részecske-) eloszlásfüggvények vonalintegrálja 1-re lett beállítva a teljes szélességben, az alábbi egyenlet alapján:

$$\int_0^w I_1(x_0, y) dy = \int_0^w I_2(x_0, y) dy = 1 \quad (30)$$

, ahol y a csatorna lokális koordinátáit jelenti egy adott keresztmetszetben x_0 pontban, w a mikrocsatorna szélességét, I_1 és I_2 pedig két különböző részecskehalmoz intenzitás függvényeit, illetve eloszlásfüggvényeit jelöli.

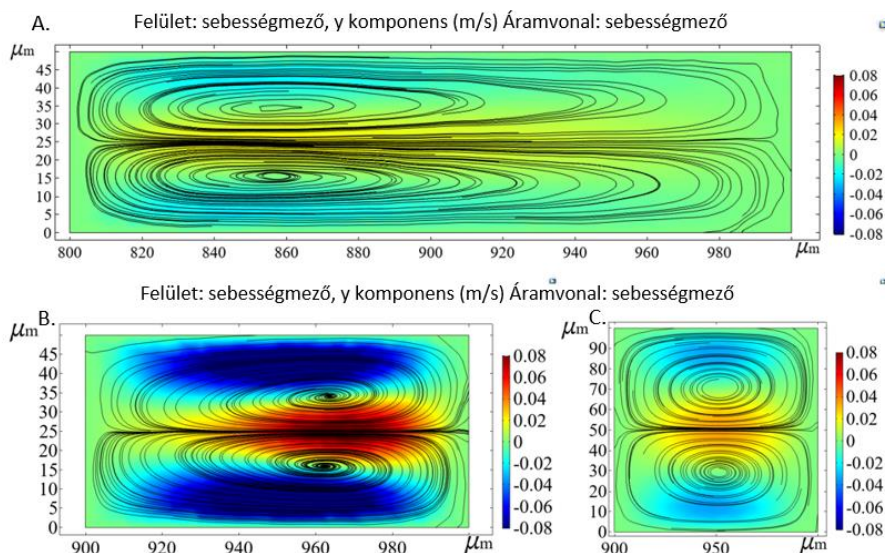
A modellezési adatokat a részecske koordináták és átmérők exportálásával összegeztem minden időlépésben. A periodikus részecskepályákat kiterjesztettem a teljes csatornahosszra és a laterális részecskepozíciók felhasználásával Poincaré térképet készítettem az adatkészletből a fluidikai csatorna legszélesebb y-z síkjában (lásd a 42. B1 ábrát). Az adatokból a részecskeeloszlás számítása a szimulációs adatok középponti koordinátáinak kiterjesztésével történt. A részecskék eloszlására vonatkozó hisztogramját a csatorna teljes keresztmetszetében kiszámítottam. A számított eloszlásokat normáltam az optikai mérésekkel való összehasonlíthatóság érdekében a (30) egyenlet alapján.



42. ábra: A kísérleti (A) és a numerikusan számított (B) adatok összehasonlítása részecskék laterális fókuszálása esetén, $1 \mu\text{L/s}$ áramlási sebességnél a H25_Wcr50 csatornában. A $4.8 \mu\text{m}$ (zöld) és a $15.8 \mu\text{m}$ (lila) átmérőjű gyöngyök pályavonalai (A1), illetve ezek laterális eloszlása a csatorna $300 \mu\text{m}$ széles keresztmetszetében (A2), amit a fluoreszcens intenzitásprofil jellemez. A FEM szimulációkkal szintén a kialakuló gyöngyeloszlást vizsgáltam a csatorna keresztmetszetében (B1 – Poincaré térkép), ami leképezhető laterális eloszlássá (B2).

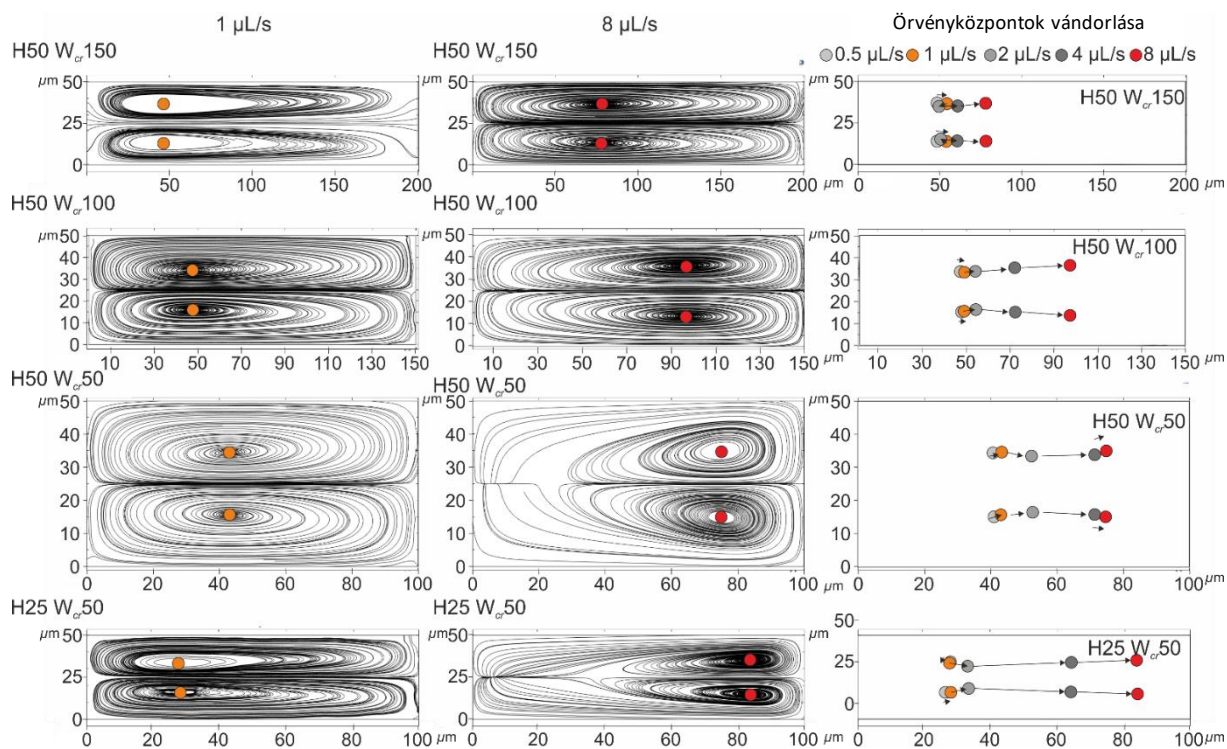
6.3.5 Dean örvények laterális eltolódásának szimulációja

A szimuláció során célom volt, hogy az áramlási sebesség függvényében megvizsgáljam az aszimmetrikus csatornában fellépő Dean-örvények kialakulását és sebességfüggő laterális eltolódását – illetve ennek hatását a különböző méretű részecskék pozícionálására. A Dean-örvények kialakulását a kanyarulatos csatornában a különböző oldalarányok függvényében jól szemlélteti a 43. ábra.



43. ábra: Dean örvények kialakulása H50_Wcr150 (A), H50_Wcr50 (B) és H100_Wcr50 (C) csatorna kisebbik kanyarulatában (szélesség: Wcr+50 μ m), 3 μ L/s áramlási sebesség mellett – végelem modellel számított sebességmező y komponense.

A szimuláció során a z irányú (csatorna irányú) áramlási sebességet 0,5 - 8 μ L/s között változtattam és a Dean örvények középpontjának vándorlását hasonlítottam össze az 50 μ m magas, változó kritikus keresztmetszetű: $W_{cr} = 150-100-50$ μ m fluidikákban, illetve a H25_Wcr50 mikrocsatornában. A sebességmező alapú áramvonalakat a csatorna-keresztmetszet y-z síkjában, a fluidikák kisebbik kanyarulatában ($W = W_{cr} + 50$ μ m) ábrázoltam, ahogy a 44. ábrán láthatóak.



44. ábra: A Dean-örvények kialakulása és középpontjaik laterális vándorlása különböző csatornaparaméterek esetén (H50_Wcr150-100-50 illetve H25_Wcr50). A sebességmező alapú áramvonalakat a kis kanyarulat ($W = W_{cr} + 50$ μ m) x-y síkjában 0,5 és 8 μ L/s áramlási sebességek mellett ábrázoltam. A harmadik oszlopban a 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 μ L/s áramlási sebességek esetén a Dean örvények középpontjának vándorlását szemléltetem.

A Navier-Stokes egyenlet végelem modellel (FEM) történő megoldása során a maximális sejtre vonatkozó Reynolds-szám 0,5 – 6 μ L/s áramlási sebességek esetén 0,09 – 3,26 között változott

és a teljes térfogatra vetített átlagos sejtre vonatkozó Reynolds szám minden esetben 0,01 – 0,79 tartományon belül maradt. A szimulációs eredmények szerint a kialakult örvények középpontjainak laterális elmozdulása a szélesebb (H50_W_{cr}150 μm) kritikus keresztmetszettel rendelkező fluidikában a legkisebb, és a szűkített fluidikában (H25_W_{cr}50 μm) a legnagyobb. A H50_W_{cr}150 csatornában (oldalarány a kritikus keresztmetszetben 1:3) 0,5 – 8 μl/s áramlási sebesség között ~40 μm-t mozdultak el az örvények központjai és a csatorna alsó felében tartották meg a laterális pozíciójukat. Ez az elmozdulás H50_W_{cr}100 (oldalarány 1:2) esetén ~50 μm, a H50_W_{cr}50 (oldalarány 1:1) esetén pedig ~35 μm. Az 1:2 oldalarányú fluidikákat összehasonlítva: H25_W_{cr}50 vs. H50_W_{cr}100, a kisebb magasság esetén a megnyúlt örvények középpontjai ~60 μm-os elmozdulást mutattak, miközben a laterális pozíciójuk a csatorna belső falától a külső fal közelébe mozdult el. Így a H25_W_{cr}50 fluidika használatával nemcsak a kisebb gyöngyök jobb laterális koncentrációját vártuk, hanem a méretfüggő szétválasztás esetén a különböző részecskék egyensúlyi pozíciójának jobb elkülönülését is.

6.3.6 Áramlási sebesség hatása a részecskék fókuszálására

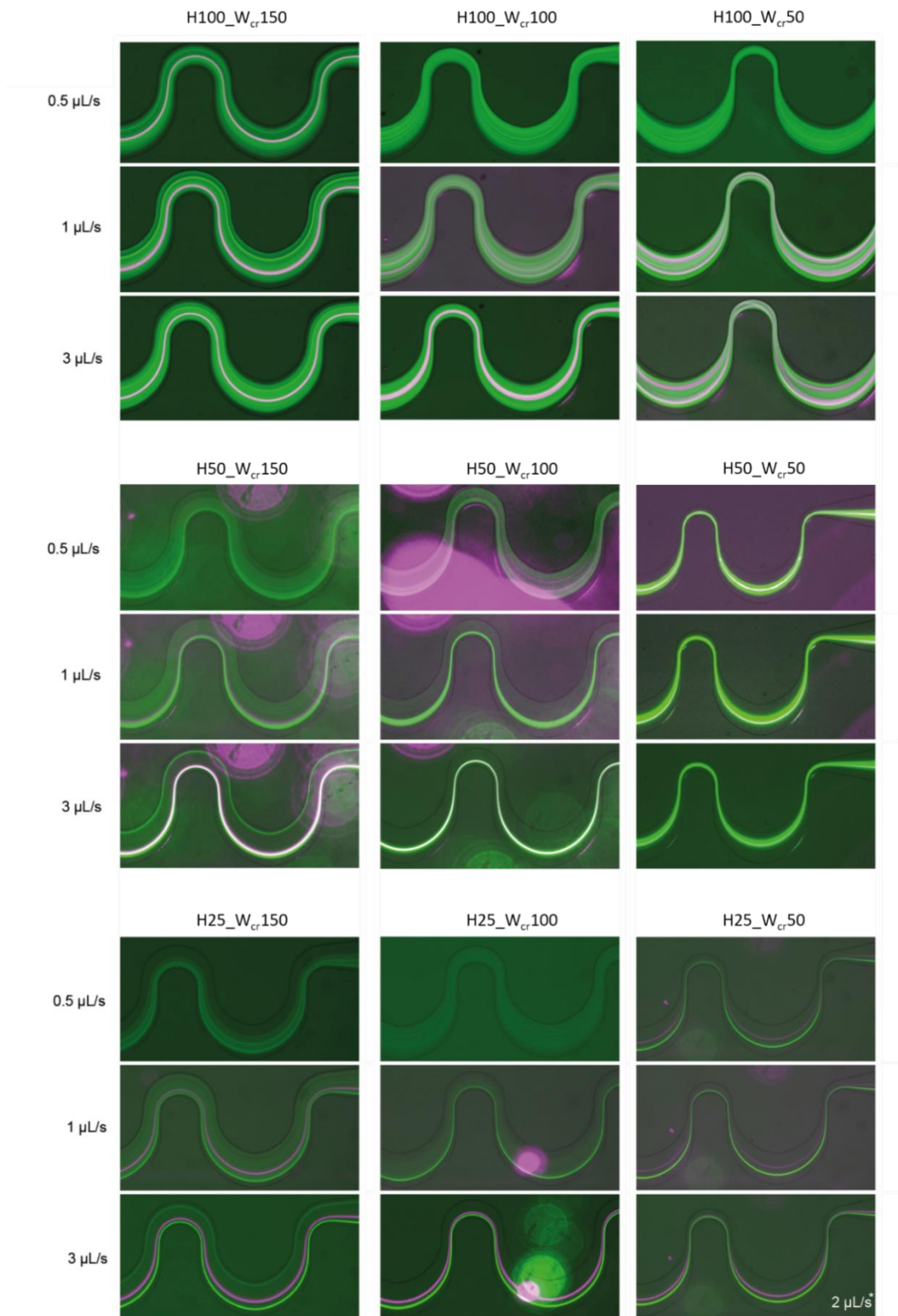
A parametrizálási kísérletek során 9 különböző geometriai jellemzőkkel rendelkező fluidikai csatornában végeztem részecske fókuszálási kísérleteket, eltérő áramlási sebességek mellett (0,5 – 6 $\mu\text{l/s}$). A kísérletekhez használt 4,8 és 15,8 μm átmérőjű gyöngyökre, illetve adott geometriával rendelkező csatornákra vonatkozó fókuszálási kritériumokat a 8. táblázat foglalja össze – szürkével jelölve azokat a sorokat, ahol az elméleti megfontolások alapján nem várunk teljes fókuszálódást. Az ehhez tartozó kísérleteket a 45. ábra rögzíti, 0,5 – 3 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebességek mellett.

H [μm]	W_{cr} [μm]	D_h értéke W_{cr} -nél	Fókuszálási kritérium (Kalkulált)		Minimum áramlási sebesség lat. fókuszáláshoz	
			15.8 $\mu\text{m}/D_h$	4.8 $\mu\text{m}/D_h$	$a = 15.8 \mu\text{m}$	$a = 4.8 \mu\text{m}$
100	150	120.00	0.13	0.04	0.5 $\mu\text{L/s}$	-
100	100	100.00	0.16	0.05	~2 $\mu\text{L/s}$	-
100	50	66.67	0.24	0.07	-	-
50	150	75.00	0.21	0.06	1 $\mu\text{L/s}$	6 $\mu\text{L/s}$
50	100	66.67	0.24	0.07	1 $\mu\text{L/s}$	~3 $\mu\text{L/s}$
50	50	50.00	0.32	0.10	0.5 $\mu\text{L/s}$	-
25	150	42.86	0.37	0.11	~0.5 $\mu\text{L/s}$	5 $\mu\text{L/s}$
25	100	40.00	0.40	0.12	~0.5 $\mu\text{L/s}$	2 $\mu\text{L/s}$
25	50	33.33	0.47	0.14	0.5 $\mu\text{L/s}$	0.5 $\mu\text{L/s}$

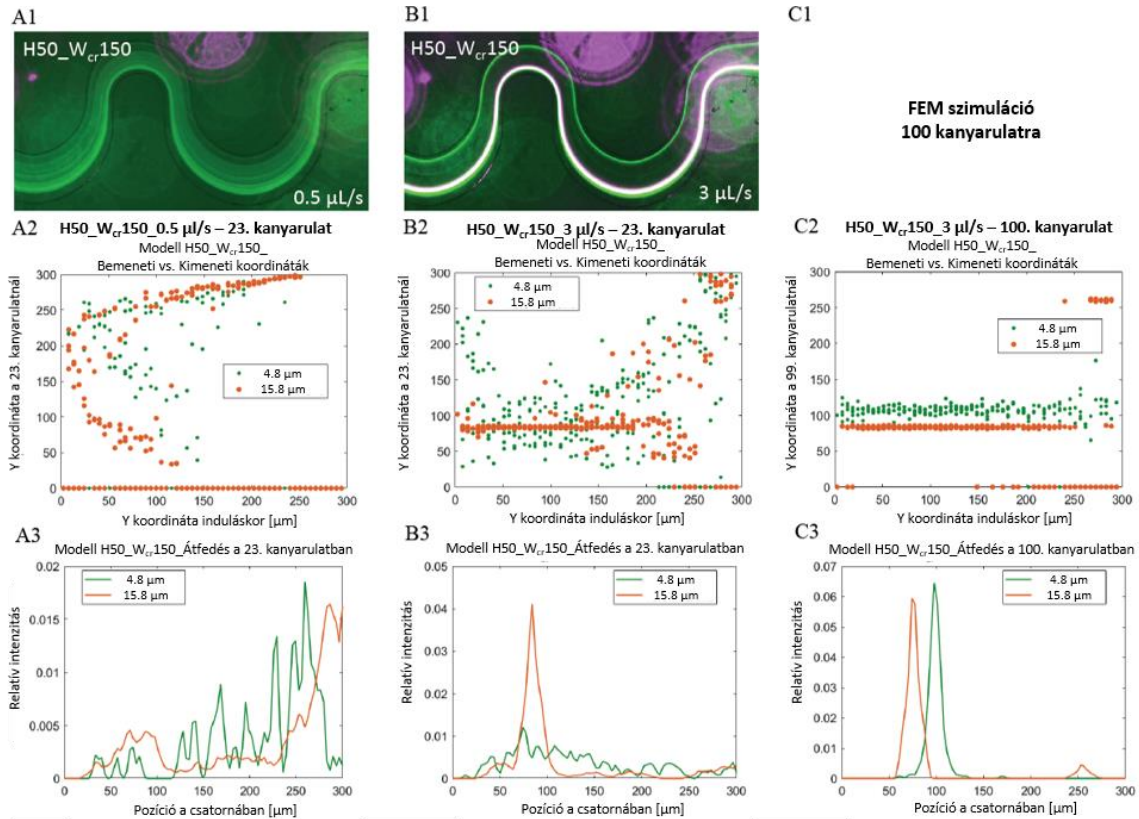
8. táblázat A laterális fókuszáló hatás paraméterfüggése: szürkével jelöltem azokat a paraméterkészleteket, amelyek nem felelnek meg az elméleti fókuszálási kritériumoknak.

A Di Carlo által prezentált geometriai kritérium alapján ($a/D_h > 0,7$) a nagyobb gyöngyök mindegyik geometriában fókuszálódnak már alacsony áramlási sebességek esetén is. Ezzel szemben nem várhatjuk a kisebbek fókuszálódását a 100 μm magas csatornában, csak a kisebb keresztmetszetek esetén. A várakozásnak megfelelően a H50_ W_{cr} 150 mikrocsatornában a 15,8 μm átmérőjű gyöngyök már 1 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebességnél fókuszálódtak, viszont 6 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebességnél a kisebb gyöngyök is (4,8 μm) annak ellenére, hogy a/D_h nem érte el a **0,07** kritikus értéket.

A 46. ábrán (87. oldalon) a kísérleti, illetve a szimulációs eredményeket vettem össze egyrészt a mérés során használt fluoreszcens gyöngyök áramlási sebesség függő laterális pozíciója, másrészt a hasonló körülmények beállítása mellett végzett véges elem szimulációban számolt Poincaré térkép alapján H50_ W_{cr} 150 geometria esetén. A kísérletek során 3 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebességnél a kisebb gyöngyök a fluidikai csatorna mindkét szélén koncentráálódtak, ezt növelve laterális pozíciójuk viszonylag stabil maradt, és 6 $\mu\text{l/s}$ -nál már egy ponton fókuszálódtak. A szimulációk szerint a kisebb gyöngyök 3 $\mu\text{l/s}$ térfogatáramnál még gyenge oldalsó koncentrációt mutatnak, azonban figyelembe véve a keresztmetszeti Poincaré térképeket, több fókuszáló csomópont is megkülönböztethető. A 15,8 μm átmérőjű gyöngyök a csatorna keresztmetszetében egy határozott laterális pozícióban két egymás fölött elhelyezkedő gyöngyhalmazban figyelhetők meg. Elmondható, hogy mindkét gyöngyméret laterálisan sűrített és az intenzitásmaximumuk majdnem teljesen átfed a hullámcsatorna alsó harmadában a csatorna y tengelyén. A 46. B1 ábra szintén a két gyöngyméret (lila – 15,8 μm , és zöld – 4,8 μm) eltérő fluoreszcens jelének átfedését mutatja.



45. ábra: Különböző méretű gyöngyök (4,8 μm –zöld; 15,8 μm – lila) laterális fókuszálódása eltérő geometriával rendelkező fluidikai csatornáknban, eltérő áramlási sebességek mellett. A H25_W_{cr}50 geometria esetén a legmagasabb áramlási sebesség 2 μL/s volt.



46. ábra: 4,8 μm (zöld) és 15,8 μm (lila, szimulációkban narancssárga) átmérőjű gyöngyök fókuszálódása a H50_Wcr150 geometriájú mikrofluidikai csatornában a 23 kanyarulat után 0,5 $\mu\text{L/s}$ (A1, A2, A3) és 3 $\mu\text{L/s}$ (B1, B2, B3) áramlási sebességek mellett. A kísérletek fluoreszcens felvételeit (A1 és B1) magyarázzák a szimulációs eredmények: a gyöngyök kimeneti y koordinátái a bemeneti y koordináták függvényében (A2, B2) és az ebből számított y-tengely menti elosztási görbe (A3, B3) a 23. kanyarulatban végén. Szimulációval meghatározható a 100. kanyarulat után kialakuló eloszlás (C2, C3), ami a fókuszálás folyamatos javulását vetíti előre.

A 46. ábra képein látható nagyobb kiterjedésű foltok műtermékek, az egyes fluoreszcens hullámtartományban (DAPI – 15,8 μm – lila, FITC – 4,8 μm – zöld) a fluidikai csatorna alatt vagy felett található szennyeződések, szórócentrumok a fókuszszíkon kívül – a laterális fókuszálásra nincsenek hatással, de valamelyest rontják a felvételek minőségét.

A kritikus keresztmetszet (H50_Wcr100) a kisebb gyöngyök körülbelül 3 $\mu\text{L/s}$ áramlási sebességnél kezdenek el fókuszálódni és a gyöngyök maximális intenzitása már egy fókuszpontba kerül, pozíciójuk laterálisan a csatorna középvonala felé tolódik. Hasonlóan a szélesebb keresztmetszettel rendelkező (H50_Wcr150) mikrofluidikákhoz a két gyöngyméret laterális pozíciója itt is közel átfedi egymást. Az áramlási sebesség 6 $\mu\text{L/s}$ -ra történő növelésével a két eltérő méretű gyöngy fókuszpontja elkezd szétválni, a kisebb gyöngyök a csatorna belső fala felé tolódnak el. A kritikus keresztmetszet további szűkítése (H50_Wcr50) esetén a fókuszálási folyamat leromlását tapasztaltam: a kisebb gyöngyök csak koncentrációkat mutattak, így a két gyöngyméret pozícióját nem lehetett egymástól elkülöníteni, ugyanis azok átfedtek. Megnövelt áramlási sebességnél (6 $\mu\text{L/s}$) a nagyobb gyöngyök pozícionálása tovább romlott: keveredni kezdtek a magasabb a/D_h paraméter ellenére. A FEM szimulációk alátámasztják a mérési eredményeket: a gyöngyök laterális pozíciója 6 $\mu\text{L/s}$ áramlási sebességnél instabil.

Megállapítható, és a mérési eredmények, illetve a FEM szimulációk is igazolták, hogy a laterális csatorna szűkítése nem javítja feltétlenül, minden határon túl a fókuszálási hatékonyságot nagyobb áramlási sebességeknél, ahol a Dean-örvényekben kialakuló húzóerők dominálják a tehetetlenségi hatásokat.

6.3.7 A mikrofluidikai hullámcsatorna hosszváltoztatásának a hatása

A 8. táblázat elméleti értékei (85. oldalon) és a 45. ábra (86. oldalon) alapján megállítható, hogy a $H50_{W_{cr}100}$ és $H50_{W_{cr}150}$ csatornában a $4,8\ \mu\text{m}$ átmérőjű részecskéket csak nagyobb áramlási sebességek ($\sim 3\ \mu\text{l/s}$, illetve $6\ \mu\text{l/s}$) mellett lehet koncentrálni, illetve végül fókuszálni. A jelenség oka, hogy a kisebb gyöngyöknek radiális irányban nagyobb távolságot kell megtenniük ahhoz, hogy elérjék egyensúlyi helyzetüket. Emiatt a nagyobb részecskékkel ellentétben a $4,8\ \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngyöknek hosszabb fluidikára lenne szükség hasonló fókuszálási hatékonyság eléréséhez.

A 46. A és B ábránkon (87. oldalon) a $H50_{W_{cr}150}$ csatornában tapasztalt fókuszálási folyamat figyelhető meg különböző áramlási sebességek mellett. Jól látható, hogy $0,5\ \mu\text{l/s}$ áramlási sebességnél egyik gyöngy sem tudott fókuszálódni a csatornában, amit a szimulációs eredmények is alátámasztanak. A $15,8\ \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngyök két külön laterális pozíciót vettek fel (lásd 47. A3 ábra). $3\ \mu\text{l/s}$ áramlási sebességnél a nagyobb gyöngyök már fókuszálódtak (lásd 46. B1 ábrán lila színnel), a kisebbek esetén még nem volt tapasztalható fókuszálás.

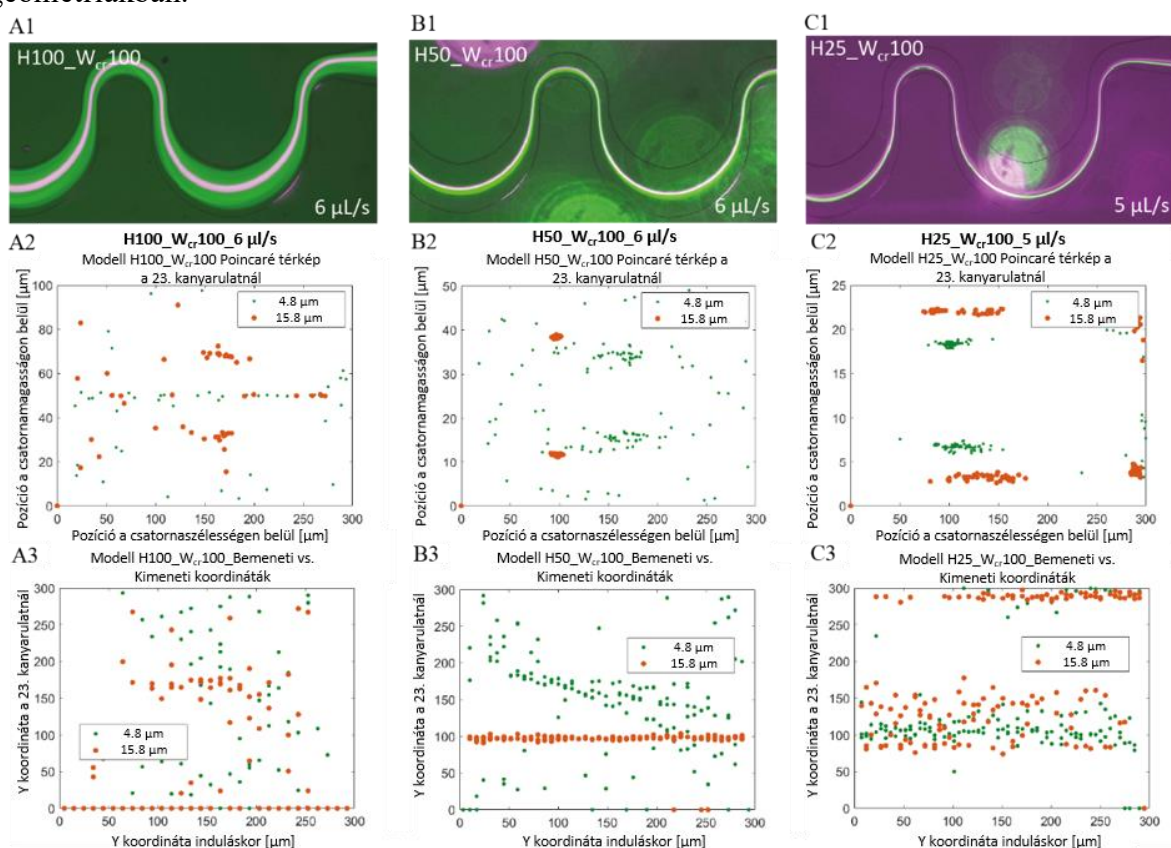
Alacsonyabb áramlási sebességek mellett a csatorna hosszának növelésével javítható a fókuszálási hatékonyság: közel négyszer hosszabb fluidikában ($\sim 16\ \text{cm}$), a 100. periódusban vizsgálva, a fókuszálási és az elválasztási hatékonyság is jelentősen javul a szimulációs eredmények alapján (lásd 46. ábra C2, C3). Ha a csatorna keresztmetszet további szűkítése helyett konzervatívabb geometriai megoldást (például $H50_{W_{cr}150}$) használunk, alacsonyabb áramlási sebességtartományban, kisebb nyíróerők mellett is létrejöhet az elválasztás hosszabb fluidikai egységben, ami előnyös lehet a biológiai sejtek számára. Ha szem előtt tartjuk a laterális fókuszáló egység integrálhatóságát a DLD vagy a keresztirányú szűrést biztosító szerkezetekkel, célszerű a miniatürizálást és az alacsonyabb áramlási sebességtartományok alkalmazását választani.

6.3.8 A mikrofluidikai csatorna oldalarányainak hatása a szeparációra

A $H100_{W_{cr}100}$, $H50_{W_{cr}100}$ és $H25_{W_{cr}100}$ mikrofluidikai csatornában (47. ábra A1-A3, B1-B3 és C2-C3), egyre javuló részecske sűrítést tapasztaltam. Nagyobb magasságok esetén a kisebb – $4,8\ \mu\text{m}$ átmérőjű – gyöngyök nem fókuszálódtak teljesen, és a pozíciójuk is átfed a nagyobb – $15,8\ \mu\text{m}$ átmérőjű – gyöngyökkel. Az alacsonyabb csatornamagasság esetén, azonos kritikus szélesség ($H25_{W_{cr}100}$ - 47. ábra C1-C3) és nagyobb áramlási sebességek mellett ($5\text{-}6\ \mu\text{L/s}$), a kisebb gyöngyméret esetén is megfelelő laterális fókuszálás alakult ki.

A kísérleti tapasztalatokat összevetve szimulációs eredményekkel, megállapítható, hogy a szimuláció magyarázza a látottakat. $H25_{W_{cr}100}$ csatorna esetén $5\ \mu\text{L/s}$ áramlási sebességnél (47. ábra C1-C3) a kisebb gyöngyök jóval koncentráltabb sávban fókuszálódtak, a csatorna alsó feléhez közelebb pozicionálódnak, elkülönülve a nagyobb gyöngyöktől. A nagyobb gyöngyök laterális fókuszálódása kissé romlott, azok egy része csak z-tengely irányában vált el bizonyos mértékig a kisebb gyöngyöktől. Csökkenő csatornamagassággal tehát javítható a részecskék fókuszálása és elválasztása – a kisebb gyöngyök laterális pozíciója középvonaltól a csatorna alsó része felé, míg a nagyobb gyöngyöké a csatorna középvonala irányában mozdul el.

A legjobb elválasztási eredményeket további magasság csökkentéssel, a $H25_{W_{cr}100}$ fluidikai csatornában kaptam, melyet a 45. ábra (86. oldalon) kísérleti adatai is megerősítenek. A $4,8 \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngyök már $0,5 \mu\text{L/s}$ áramlási sebesség esetén is fókuszálódtak. A kritikus szélesség csökkentése ellenére a nagyobb gyöngyök laterális fókuszálása is stabil maradt ezekben a geometriákban.



47. ábra: $4,8 \mu\text{m}$ és $15,8 \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngyök laterális fókuszálása $100 \mu\text{m}$ kritikus szélességgel és $100\text{-}50\text{-}25 \mu\text{m}$ csatornamagasságokkal rendelkező különböző mikrofluidikai csatornák esetén 5 és $6 \mu\text{L/s}$ áramlási sebességek mellett. A kísérletek során készített fluoreszcens mikroszkópos felvételek $4,8 \mu\text{m}$ (zöld) és $15,8 \mu\text{m}$ (lila) átmérőjű gyöngyöket esetén (felülnézet) (A1, B1, C1). Modellezett Poincaré térképek (A2, B2, C2) – a gyöngyök csatornakeresztmetszetben felvett pozíciója a 23. kanyarultnál. A gyöngyök y-tengely mentén felvett pozíciója a 23. kanyarulat végén a bemeneti síkon elfoglalt pozíciójuk y-koordinátájának függvényében (A3, B3, C3).

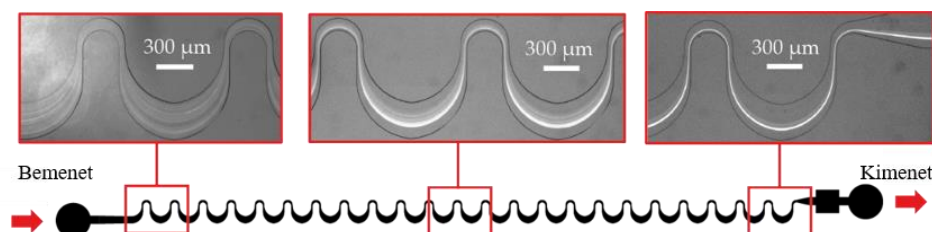
Kisebb kritikus csatornakeresztmetszetek alkalmazásával a gyöngyök hamarabb eléri az méretükre jellemző egyensúlyi pozíciójukat, de az extrém nagy sebességek és a másodlagos áramlás indukálta Dean-örvények könnyen elronthatják a fókuszálást, ha dominánssá válnak. Amint azt kísérletekkel és in silico modellekkel is bizonyítottuk, az alacsony csatornamagasság jelentős előnnyel rendelkezik a fókuszálási és elválasztási hatékonyság tekintetében, és nagyobb áramlási sebességek esetén is megbízhatóan viselkedik.

A mérések alapján elmondható, hogy a kisebb $4,8 \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngyöket sikerült fókuszálni nagyobb áramlási sebességgel $50 \mu\text{m}$ magas és $100 - 150 \mu\text{m}$ kritikus szűkülettel rendelkező fluidikai csatornában ($H50_{W_{cr}100} - H50_{W_{cr}150}$) annak ellenére, hogy az elméleti a / D_h paraméter kisebb a kritikus határtól ($0,7$ – lásd 8. táblázat -85. oldalon). Ennek megfelelően megállapítható, hogy az alacsony oldalárányú csatornák ($0,5 - 0,33$) előnyösebbek a laterális fókuszálás szempontjából a nagyobb áramlási sebességeknél. A $15,8 \mu\text{m}$ átmérőjű gyöngyöknél hatékony fókuszálás figyelhető meg a nagyobb gyöngyökre dominánssabban ható tehetetlenségi

emelőerők miatt, azonban túl szigorú csatorna szűkület (nagy oldalarány) esetén, a kialakuló Dean-örvények okozta húzóerő dominánssá válása keveredést idéz elő – például a H100_W_{cr}50 csatornában. Az áramlási sebesség emelése rontja a lokális fókuszálási pontok kiterjedését. Hasonló jelenség figyelhető meg a H50_W_{cr}50 csatornában már 1 μL/s áramlási sebességnél (45. ábra – 86. oldalon), a 4,8 μm átmérőjű gyöngyök egyetlen laterális pozícióban történő fókuszálása nem történik meg, csupán azok koncentrációja.

6.3.9 A H50_W_{cr}50 és H25_W_{cr}50 típusú mikrofluidikai hullámcsatornák vizsgálata

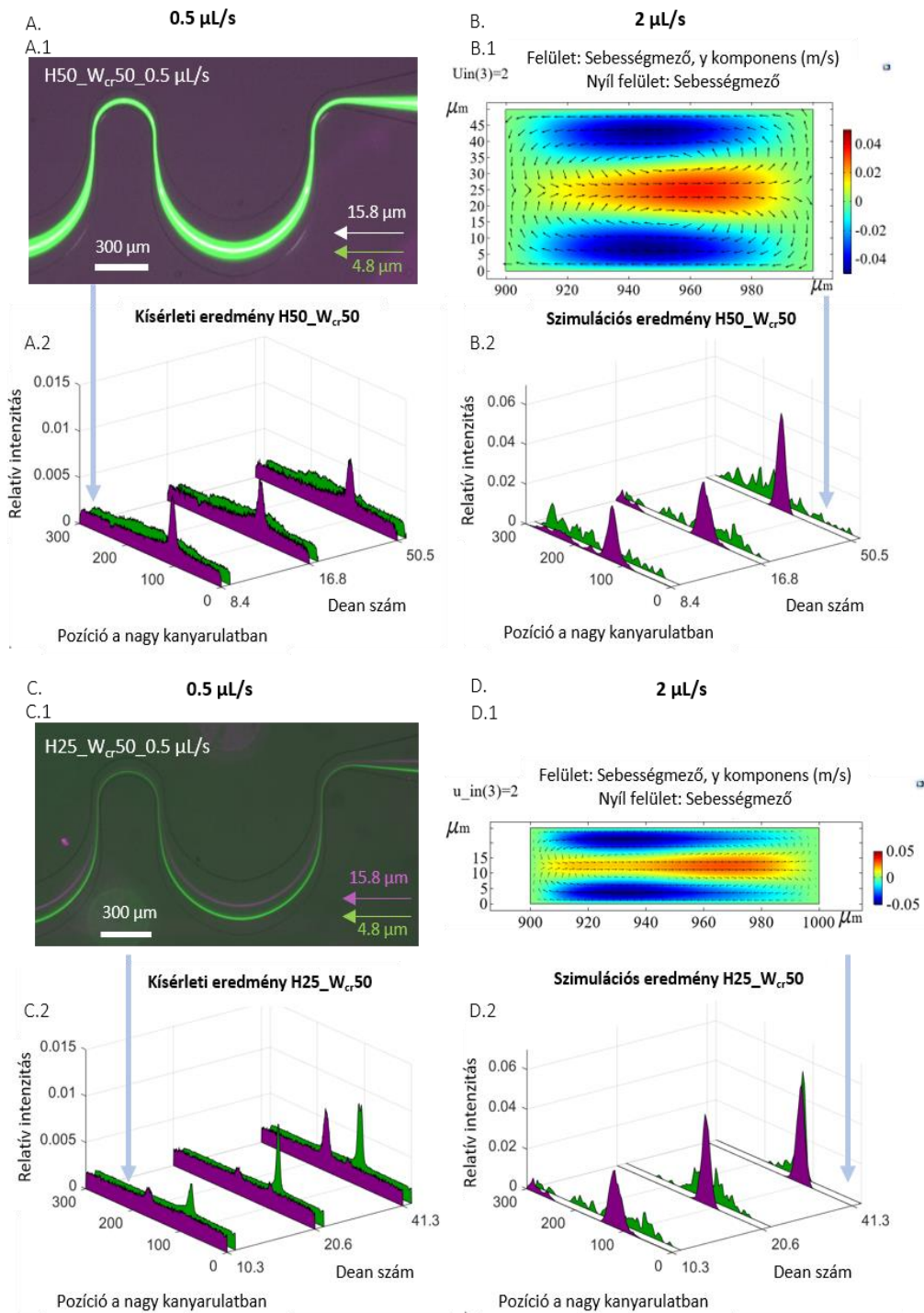
Az alacsony oldalaránnyal rendelkező csatornák – H25_W_{cr}50 – tehát előnyösebbnek bizonyultak a kisebb gyöngyök laterális fókuszálásának szempontjából, ugyanis azok laterális migrációja, és egyensúlyi pozíciójuk elfoglalása hosszabb időt vesz igénybe, amit a H25_W_{cr}50 fluidika mentén felvett képek is alátámasztanak (lásd 48. ábra).



48. ábra 4,8 μm átmérőjű fluoreszcens gyöngyök laterális fókuszálásának alakulása a H25_W_{cr}50 fluidikában: a bemenetnél, a csatorna közepén, illetve végén (a 23. görbületnél) –fluoreszcens felvételek.

A kísérleti és szimulációs eredmények összevetése a H50_W_{cr}50 és H25_W_{cr}50 paraméterezésű mikrofluidikai rendszerek esetén a 49. ábrán láthatóak. A kísérletek során a 4,8 μm és 15,8 μm átmérőjű gyöngyök viselkedését vizsgáltam 0,5, 1, 2 μl/s áramlási sebességek mellett. A modellezett sebességtérképek szemléltetik a csatorna keresztmetszetében áramlási sebességeloszlás laterális komponenseinek (a sebességmező y komponense) nagyságát, ahol a vörös szín a laterális Dean-örvény jobbra mutató (pozitív y irányú), a kék szín pedig a balra mutató (negatív y irányú) részét szemlélteti. Látható, hogy a nyilakkal jelölt sebességmezőkben magasabb oldalarány esetén (H50_W_{cr}50 - 49. B1 ábra) sokkal kiemelkedőbb és szimmetrikusabb Dean-örvények alakultak ki, mint az alacsonyabb csatornában (H25_W_{cr}50 - 49. D1 ábra). A H50_W_{cr}50 fluidikában a nagyobb gyöngyök (15,8 μm) már 0,5 μl/s áramlási sebességnél is koncentrációdtak, azonban a kisebbek megnövelt áramlási sebességek esetén sem.

A mikrofluidikai rendszerekben a 4,8 μm átmérőjű gyöngyök egészen 3 μl/s áramlási sebesség értékig fokozatosan koncentrációdtak (lásd 45. ábra, 86. oldalon). H25_W_{cr}50 geometriában mindkét gyöngyméret fókuszálása sikeres volt. A vizsgált geometriák esetén kísérleti tapasztalatok összhangban vannak a szimulációs eredményekkel (lásd 49. ábra). A szimulációk segítségével meg lehetett jósolni a határos fókuszálási paramétereket és a gyöngyök laterális eloszlásának jellegét, azonban a fókuszpontok pontos kialakulásának helyét nem teljes mértékben. Ezekben a mikrofluidikai rendszerekben a fókuszálás 0,5-1-2 μl/s áramlási sebességek ($De = 10 - 40$) mellett is sikeres volt annak ellenére, hogy Dino Di Carlo [92] szerint a Dean örvények jellemzésére használt Dean számok értéke nem léphet át egy kritikus $De = 20$ értéket, ekkor ugyanis a dominánssá váló Dean örvények ronthatják a fókuszálást.



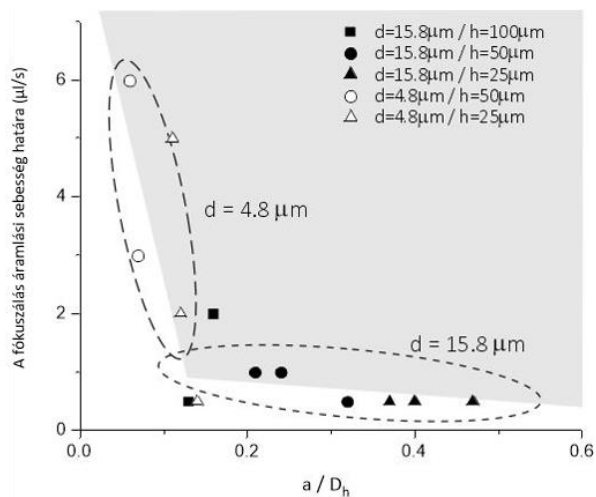
49. ábra: Rigid polisztírol gyöngyök (\varnothing 4,8 és 15,8 μm) viselkedésének szemléltetése eltérő oldalirányú kritikus keresztmetszettel rendelkező H50_ $W_{cr}50$ és H25_ $W_{cr}50$ fluidikai csatornáknál 0,5 – 1 – 2 $\mu\text{L/s}$ áramlási sebességek (ebből számított Dean számok) mellett. Kísérleti eredmények: a kimeneten felvett gyöngypozíciók detektálása fluoreszcens intenzitás alapján (A.1 – A.2 és C.1 – C.2). A numerikus szimulációk eredményei szemléltetik a sebességmező x-y síkban kialakuló eloszlását a csatorna kisebb kanyarulatában ($W_{cr} + 50 \mu\text{m}$) 2 $\mu\text{L/s}$ áramlási sebesség mellett (B.1, D.1), illetve a gyöngyök laterális (y tengelyen vett) eloszlását 23 kanyarulat után (B.2, D.2).

6.3.10 Laterális fókuszáló mikrofluidikai rendszer optimalizálásának eredménye

Megfelelő geometriai paraméterekkel – 3,5 cm hosszúsággal, 25 μm magassággal és 50 μm kritikus szélességgel – rendelkező periodikusan változó keresztmetszetű aszimmetrikus kanyarulatokból álló mikrofluidikai rendszerben sikeresen fókuszáltam és szeparáltam egymástól két eltérő méretű részecskét ($\varnothing = 4,8 \mu\text{m}$ és $15,8 \mu\text{m}$) 1 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség mellett. A kisebb részecskék sikeres fókuszálása érdekében csökkenthetjük a csatorna keresztmetszetet, növelhetjük a csatorna hosszát (periódusszámot), azonban minden esetben számolnunk kell felhasználandó minta mennyiségével, és a fluidika átteresztőképességével.

Az aszimmetrikus mikrofluidikai hullámcsatornát 50-100-150 μm kritikus szélességekkel és 25-50-100 μm magasságokkal terveztem meg. Az alacsonyabb oldalarányokkal rendelkező csatornák (1 – 0,16) előnyösebb megoldásnak bizonyultak az alkalmazható áramlási sebességtartományokban – ahogy azt a 8. táblázatban összefoglaltam (85.oldalon). 100 μm csatornamagasság mellett – melynél az oldalarányt 2 és 0,66 között határoztam meg a kritikus szűkületekben, a kisebb gyöngyök fókuszálása lehetetlen volt.

A 50. ábrán látható a fókuszáláshoz szükséges áramlási sebesség minimumok a 4,8 μm és 15,8 μm átmérőjű gyöngyök esetén. A szükséges áramlási sebesség értékek extrém paraméterfüggőséget mutattak abban a tartományban, ahol a/D_h megközelíti a 0,07 kritikus értéket.

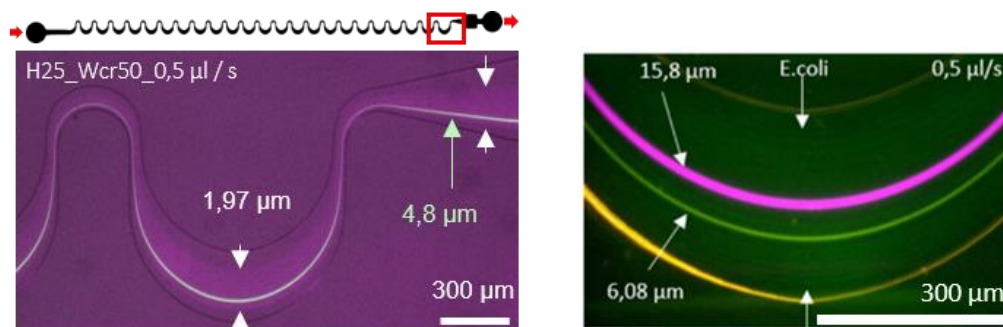


50. ábra: Adott méretű részecske fókuszáláshoz minimálisan szükséges áramlási sebesség az a / D_h geometriára jellemző érték függvényében. A szaggatott körök a 4,8 μm , illetve 15,8 μm átmérőjű gyöngyökhöz tartozó adatokat jelölik.

6.3.11 Élő sejtek viselkedése periodikusan változó keresztmetszetű kanyarulatos mikrofluidikai csatornában

A korábban bemutatott kísérleti eredmények segítségével optimalizáltam a laterális fókuszálásra alkalmas fluidikai csatorna geometriai paramétereit, 4,8 μm és 15,8 μm átmérőjű gyöngyök felhasználásával. Az eredmények alapján – a gyöngyméreték stabil elválasztása és fókuszálhatósága miatt a H25_Wcr50 fluidikai egységre esett a választás.

Az első biológiai mérések során egyértelművé vált, hogy a fluoreszcens mérésekhez alkalmazott rigid gyöngyök nem tudnak teljes képet adni a gömb formától eltérő biológiai sejtek laterális fókuszálódásának mértékéről. Kezdetben 1,97 μm átmérőjű gyöngyöket alkalmaztam a minta oldatban az *E. coli* baktériumok modellezésére, azonban azok jobb koncentrációkat mutattak a fókuszáló csatorna végén, mint az *E. coli* baktériumok, ahogy azt a 51. ábra szemlélteti.



51. ábra: A célrészecskéként választott $\varnothing = 1,97 \mu\text{m}$ átmérőjű rigid gyöngyök és a GFP- *E. coli* baktériumok koncentrációjának összehasonlítása a 4,8 μm , illetve a 6,08 μm és a 15,8 μm átmérőjű gyöngyök mellett, 0,5 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség alkalmazásával.

A választott fluidikai egységben 0,5-1-2 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebességek mellett vizsgáltam a $\varnothing = 0,5 - 16,5 \mu\text{m}$ átmérővel jellemezhető rigid gyöngyök viselkedését, hogy definiálni tudjam azokat a mérettartományokat, amelyek jól alkalmazható modellt adnak biológiai minták esteire is. Felállítottam egy térképet azok laterális fókuszálódási pozícióiról, és ebben elhelyeztem 4 fontos biológiai célmintát (lásd 9. táblázat) a koncentrációjuk mértékének, illetve laterális pozícióik alapján. A vizsgálatok során tehát kerestem azt a gyöngyméret tartományt az adott biológiai célsejtre, amely legjobban leírja annak fókuszálódásának mértékét.

	Használt sejtek	Morfológia	Méret		A modell gyöngyök mérete (\varnothing)
			Magasság	Szélesség	
Baktérium [164]	<i>E. coli</i>	pálcika alak	0,5 μm	2 μm	0,5 – 1,1 – 1,97 μm
Hematopoetikus [165] [166]	Vörös vértés	korong alakú bikonkáv	2,5 μm	6-8 μm	2,9 – 4,8 – 5,4 – 6,08 μm
Élesztő gomba [167]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	kerek vagy ovális	5-10 μm		5,4 – 6,08 – 10,2 μm
Rákos sejtvonal [168]	HeLa sejt	változatos, inhomogén, szuszpenzióban gömb alakú	16-29 μm		15,8 – 16,5 μm

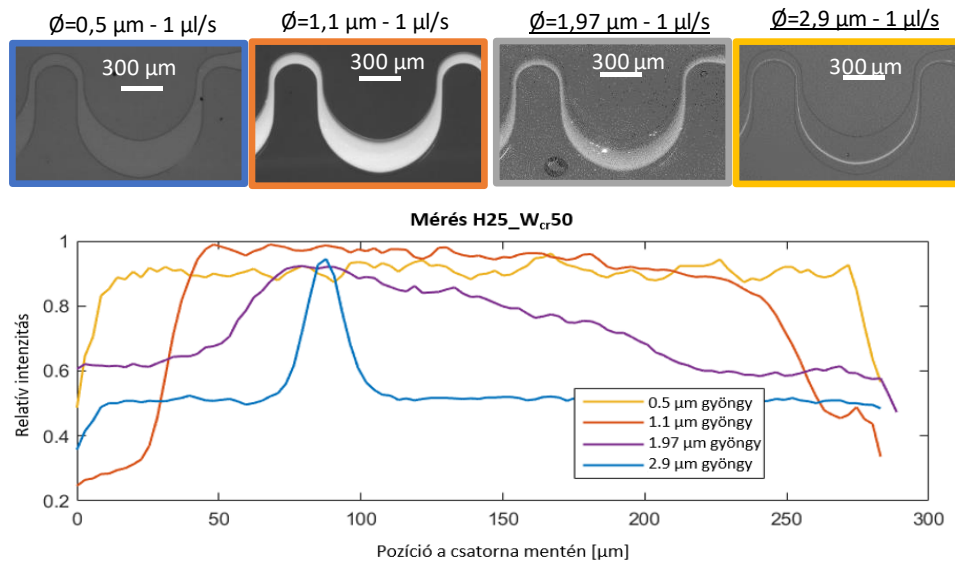
9. táblázat A vizsgált biológiai minták jellemzői, és a modell gyöngyök, mellyel laterális fókuszálódási pozíciójuk összevetésre került.

Az *E. coli* koncentrációjának mértékét a 0,5 – 1,1 – 1,97 μm méretű rigid gyöngyök viselkedésével hasonlítottam össze, amelyeket modellként használtam. Kisebb gyöngyméretű esetén a Dino Di Carlo [6] által meghatározott fókuszálási kritériumokat – $a / D_h > 0,07$ – nem sikerült elérni. A modell gyöngyök a / D_h arányai a következők: 0,015 (\emptyset 0,5 μm esetén); 0,033 (\emptyset 1,1 μm esetén); 0,059 (\emptyset 1,97 μm esetén), ahogy azt a 10. táblázat összefoglalja.

H25_W _{cr} 50 (1 $\mu\text{l/s}$)	Részecskeméret (a) (μm)	a / D_h	Fluoreszcens sáv pozíciója (0–300 μm)	Intenzitáscsúcs pozíciója (μm)
Polisztirol gyöngyök	0,5	0,015	[0–300]	-
	1,1	0,033	[22,6–283]	-
	1,97	0,059	[25,5–226,4]	-
	2,9	0,087	[67,9–107,5]	90
	4,8	0,144	[78,6–114,3]	98.2
	5,4	0,162	[126,8–160,8]	138
	6,08	0,182	[117–162]	135
	10,2	0,306	[103,03–127,3]	117
	15,8	0,474	[151,5–178,6]	164.2
<i>E. coli</i>	0,5	0,015	[28,37–294,3]	-
	2,0	0,060		
VVT	2,5	0,075	[91,8–143,9]	126
	8,0	0,240		
Élesztőgomba	5,0	0,150	[82,7–134,7]	105
	10,0	0,300		
HELA	16,0	0,480	[162,4–197,9]	174
	29,0	0,870		

10. táblázat: Laterális fókuszáláshoz használt célminták paramétereit és koncentrációjuk mértékét, annak laterális pozícióját a H25_W_{cr}50 mikrofluidikai csatorna végén – a 23. kanyarulatban mérve, melynek szélessége 300 μm .

Az alkalmazott áramlási sebességek (0,5 – 2 $\mu\text{l/s}$) és csatornahossz (3 cm) mellett egyik gyöngy sem fókuszálódott a H25_W_{cr}50 fluidikai egységben. A méretük növekedésével a gyöngyök koncentrációjának hatékonysága növekszik, vagyis a csatorna kitöltése a teljes szélességéhez viszonyítva fokozatosan csökkent 100% -ról, 86,8%-ra, végül 67 %-ra 1 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség mellett. A bemutatott elméleti modell alapján az egyetlen pontban történő oldalirányú fókuszálás csak 2,4 μm -nél nagyobb átmérőjű gömb alakú gyöngyökkel lehetséges. A kísérletek során az alkalmazott modellgyöngyök közül csak a 2,9 μm átmérőjű gyöngyök ($a / D_h = 0,087$) fókuszálódtak a 3 cm hosszú mikrofluidikai csatorna végéig (52. ábra).



52. ábra: A H25_W_{cr}50 mikrofluidikai rendszerben vizsgált legkisebb gyöngyök ($\varnothing = 0,5 - 1,1 - 1,97 - 2,9 \mu\text{m}$) koncentrációjának mértéke a csatorna végén.

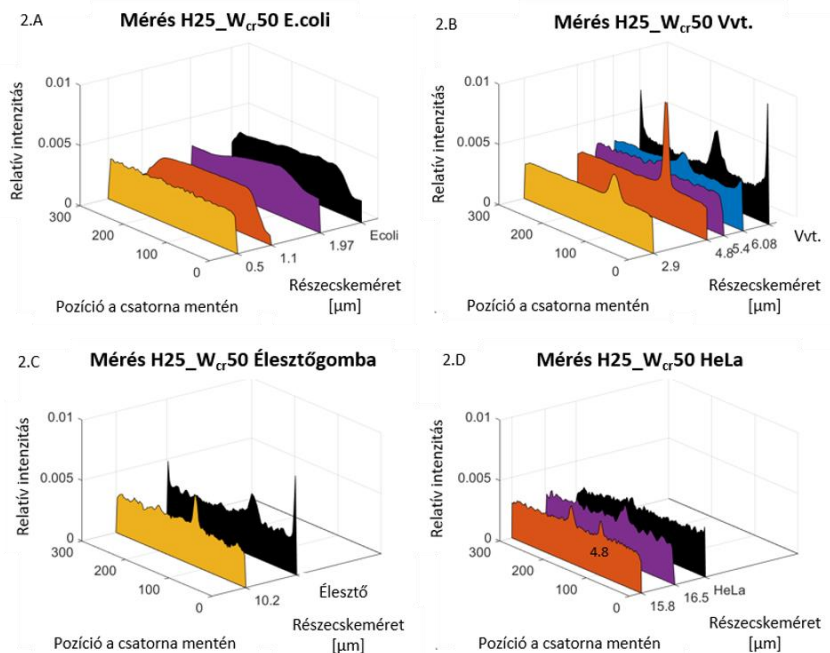
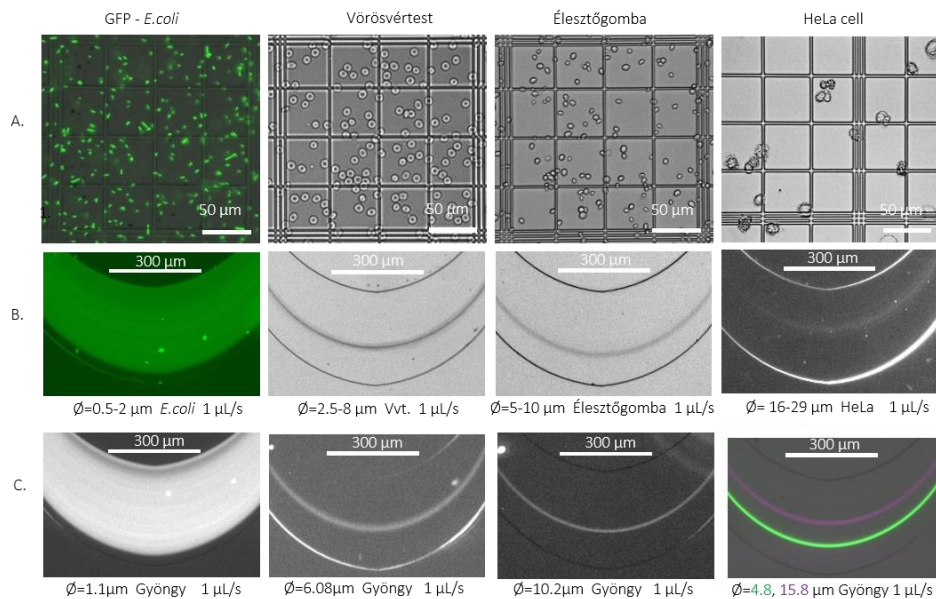
A fenti elméleti megfontolások és kísérletek alapján, méretéből adódóan az *E. coli* sem fókuszálódik, csak koncentrálódik a periodikus csatornában, melynek mértéke 88,6%, ami leginkább az 1,1 μm átmérőjű gyöngyök profiljához hasonlít. Ennek megfelelően azt tekintetem a baktérium viselkedését legjobban leíró ekvivalens gyöngymodelnek. Feltételezhető, hogy a pálcika alakú *E. coli* baktérium a hossz tengelyével párhuzamosan rendeződik az áramlás irányába, és csak kisebb billegő mozgást végez.

A vörösvértetek (vvt.) alakja bicoid bikonkáv, az átlagos sejtátmérő 6-8 μm , vastagsága pedig 2,5 μm körüli. A vérmintához a 77 Elektronika által jutottunk vérellátón keresztül. A vért PBS pufferben 100 szorosra hígítva vizsgáltam. A fluoreszcens gyöngyök közül ($\varnothing = 2,9 - 4,8 - 5,4 - 6,08 \mu\text{m}$) a 6,08 μm átmérőjű modellezte leginkább a Vvt. laterális pozícióját, amit magyarázhat, hogy az nagyobb térfogat alapján, pörgő mozgást végezve pozicionálóik az áramlásban.

Az élesztőgombákat 0,5 mg/ml tömeg/térfogat koncentrációjú PBS-oldatban diszpergáltam, és hígítottam a térfogat 10-szeresére. A sejtek Bürker-kamrás számlálásakor az átlagos sejt méret 9,75 μm -re adódott, alakjuk ovális, kerekded. Ebben az esetben 5,4 - 6,08 - 10,2 μm átmérőjű gyöngyöket használtam modellezésre. A tapasztalatok szerint a 10,2 μm átmérőjű merev részecskék laterális pozíciója mutatott legnagyobb átfedést az élesztőgomba laterális pozíciójával (lásd 53. ábra).

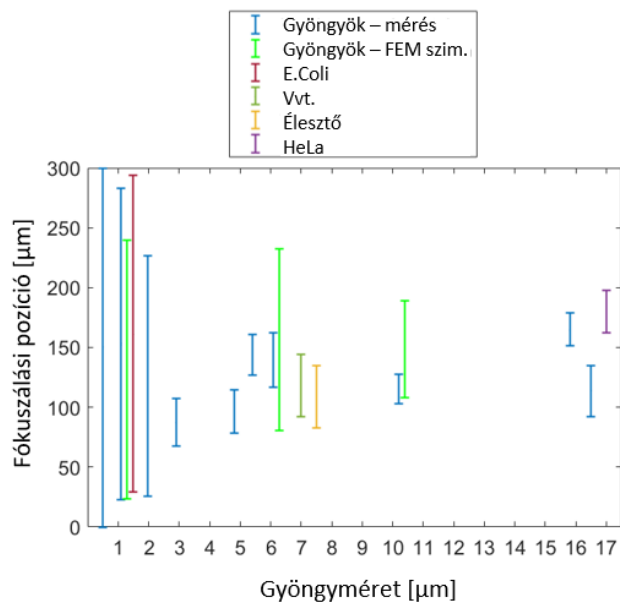
Az irodalmi áttekintés alapján a HeLa sejtek mérete a 16–29 μm -es tartományban mozoghat, emiatt a mérés kockázatos volt a 25 μm magasságú fluidikai csatornában. Fluoreszcens gyöngyök közül, a 15,8 μm méret írta le legjobban a HeLa sejt pozícióját. A rendelkezésünkre bocsátott HeLa szuszpenziót PBS-oldattal hígítottam, és a tényleges sejt méretet Bürker kamrában mértem. Az átlagos egyedi sejt méretet körülbelül 24 μm volt, azonban a változatos alak és méretek mellett akadtak olyan aggregátumok, melyek mérete elérte a 61 μm -t is és ezek eltömíthették a fluidikai csatornát. A tapasztalatok szerint a fluoreszcens modellgyöngyök fókuszálása során a 15,8 μm

átmérőjű gyöngyök 300 μm széles kanyarulatban felvett laterális pozíciója, fed át leginkább a HeLa sejtek fókuszszájával (lásd 53. ábra B és C.).



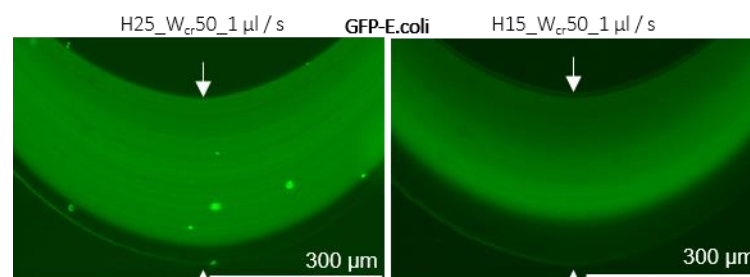
53. ábra: Biológiai sejtek és merev modellgyöngyeik laterális fókuszálódása H25_W_{cr}50 csatornában 1 $\mu\text{L/s}$ áramlási sebességek mellett. Az alkalmazott biológiai célminta méretét és morfológiáját Bürker kamrában vizsgáltam (A), laterális fókuszálódásuk mértékét fluoreszcens (GFP-*E. coli*) vagy sötétlátóteres felvételekkel rögzítettem a fluidikai csatorna végén (B). A vizsgált modell gyöngyök viselkedését hasonlítottam a biológiai célminták fókuszálódásához (C). A 8. táblázatban párosított biológiai minták és modell gyöngyök laterális eloszlását mutatják a grafikonok (D). Az *E. coli* baktériumokat 0,5; 1,1 és 1,97 μm átmérőjű polisztirol gyöngyökkel; a vörösvértesteket 2,9; 4,8; 5,4 és 6,08 μm átmérőjű gyöngyökkel; a *Saccharomyces cerevisiae* (élesztő)gombákat 10,2 μm átmérőjű gyöngyökkel; a HeLa sejteket pedig 4,8; 15,8 és 16,5 μm átmérőjű polisztirol gyöngyökkel hasonlítottam össze.

Az alkalmazott H25_W_{cr}50 fluidikai rendszerben meglehetősen széles tartományban lehetséges a részecskék laterális pozicionálódása. A tesztek során alkalmazott 0,5 – 16,8 µm átmérőjű gyöngyök pozíciótérképe jellegzetes tendenciát rajzolt ki. Az alkalmazott gyöngyök közül a 2,9 µm átmérőjű gyöngyök már gond nélkül fókuszálódtak, az elfoglalt méret szerinti laterális pozíciójuk alapján elválaszthatóvá váltak egymástól. Az egyes biológiai célminta méretbeli szórása nagyobb, mint az alkalmazott, mesterséges fluoreszcens gyöngyöké, ennek ellenére a modell gyöngyök meglehetősen jó átfedéssel határozták meg a biológiai minták laterális fókuszálódási pozícióját, ahogy azt a 54. ábra mutatja.



54. ábra: A 9. táblázat célmintái alapján felrajzolt fókuszálási pozíciótérkép különböző méretű rigid polisztirol gyöngyök és egyes biológiai célszervek esetén. A grafikonban feltüntettem egyes méretek modellezés alapján számolt laterális pozícióját is.

Az E. coli koncentrációs hatékonysága bizonyos mértékig javítható a csatorna magasság további csökkentésével. 15 µm magasságú (lásd 55. ábra) mikrofluidikai rendszerben a koncentráció a csatorna keresztmetszet 77 %-ára csökkenthető 1 µl/s áramlási sebesség mellett. Megjegyzendő, hogy az ilyen drasztikus méretcsökkentés nemcsak a teljes fluidikai rendszer átteresztő képességét rontja, de a dugulás veszélyét is megnöveli.



55. ábra: A GFP-E. coli baktérium koncentrációja alacsonyabb 15µm magas fluidikában hatékonyabbnak bizonyult.

Összefoglalásként elmondható, hogy **az alacsony oldalarányú csatornák (0,5 – 0,33) előnyösebbek a laterális fókuszálás szempontjából a nagyobb áramlási sebességeknél.** H25W_{cr}50 jelű fluidikai rendszerben volt a leghatékonyabb az laterális fókuszálás 0,5 - 2 μL/s áramlási sebességek között, melyben elméleti modell alapján $\varnothing > 2,4 \mu\text{m}$ -nél nagyobb gömb alakú gyöngyökkel lehetséges a fókuszálás. A kísérletek során az alkalmazott modellgyöngyök közül csak a 2,9 μm átmérőjű gyöngyök ($a / D_h = 0,087$) fókuszálódtak a 3 cm hosszú mikrofluidikai csatorna végéig. A módszer előnye, hogy méret szerint képes szegregálni egy csatornán belül, és így a kivezetések jó megválasztásával elkülöníthetők részecske szubpopulációk. A hatékonyságot megfelelő gyöngytérkép felállításával is szemléltettem, azonban kisebb célsejtek fókuszálásánál a csatorna keresztmetszet jelentős csökkentése már az átteresztőképesség korlátozásával jár.

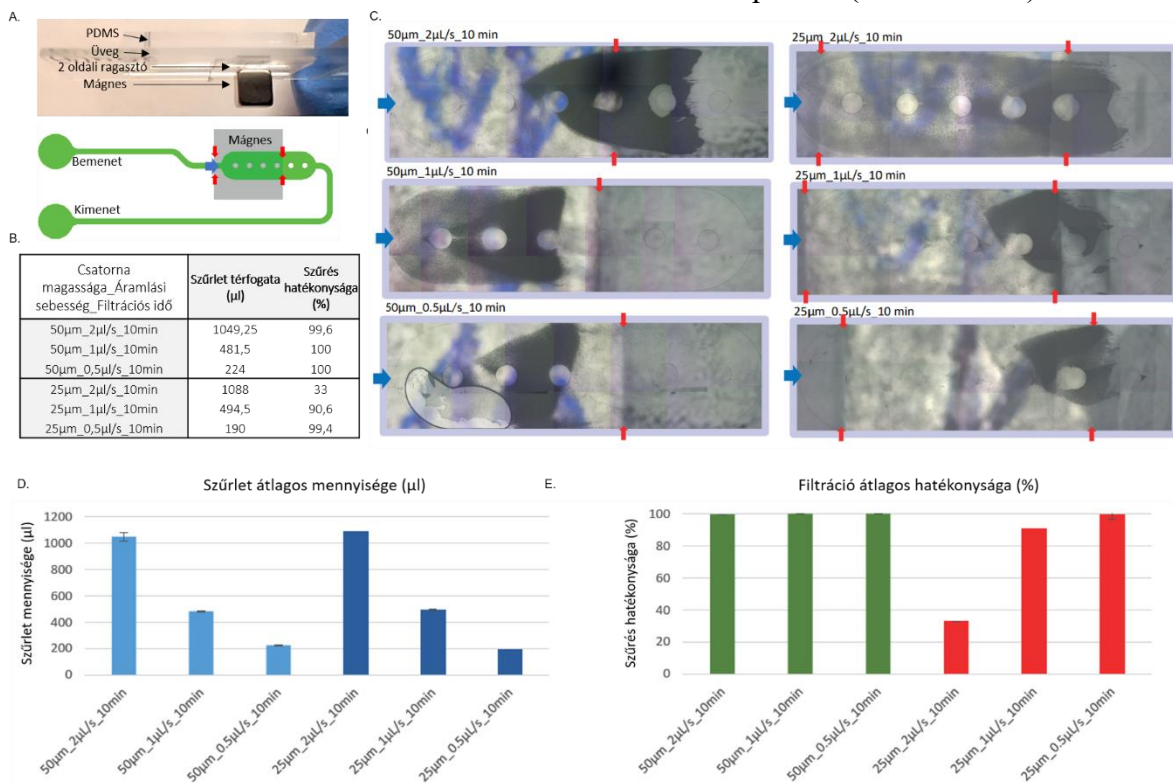
A módszer fizikai modellezéséhez korlátozottan alkalmazható FEM szimuláció, a laterális fókuszálás (gyöngyök és élő sejtek laterális pozícióinak) vizsgálata során is látható volt, hogy a FEM szimulációs becslések megközelítőleg tudták meghatározni azt a tartományt, melyben a legnagyobb valószínűséggel találhatóak a gyöngyök. A modellezett részecske központi pozíció eloszlása megfelelt a kísérletben tapasztaltaknak, viszont a modellben a gyöngyök koncentrálódása rosszabb volt, azaz annak kiterjedése a csatorna keresztmetszetben szélesebb volt a korlátozott tesztelt részecskeszám miatt (1000). A kísérleti eredményekkel összehasonlítva az esetek többségében háromszor jobb fókuszálási hatékonyság volt tapasztalható a kísérletek során, mint a FEM szimulációs előrejelzés.

Az alkalmazott polisztirol részecskék megfelelő egyszerűsített modellként szolgálnak, amelyek megbízhatóan használhatóak az alapvető áramlási jelenségek vizsgálatára, fluidikai egységek tesztelésére, egyszerűbben alkalmazhatóak véges elem szimulációkban, azonban a tesztek nem helyettesítik a valós mintán történő vizsgálatokat. A polisztirol gyöngyök a célminta specifikációjától (fizikai, kémiai paraméterek, egymással való kölcsönhatásaik, a mikrofluidikai kazettával mutatott kölcsönhatásaik, a médiumban uralkodó töltésviszonyok, pH stb.) akár nagy mértékben is eltérhetnek, ebben az esetben már nehezebben tekinthetők tökéletes modellnek.

6.4 Mágneses szeparáció

6.4.1 Kísérleti elrendezés és beállítás optimalizálása

Az aktív szeparációs módszerek alkalmazásai lehetőségeit, sejtek és részecskék magnetoforetikus csapódásával kapcsolatosan vizsgáltam. A kísérleteim célja az volt, hogy szuperparamágneses részecskéket, és a részecskékre kötött sejteket a mikrofluidikai rendszer érzékelési régiójában célzottan tudjam rögzíteni az analitikai mérések idejére. A mérések során alkalmazott üvegre bondolt PDMS mikrofluidikában a mágneses fluxust egy, az üveg alatt rögzített permanens neodímium mágnes biztosította. Az első vizsgálatok során 25 és 50 μm magasságú mikrofluidikai szerkezeteket terveztem kör alakú tartóoszlopokkal (lásd 56. ábra).



56. ábra: Mágneses csapódás hatékonyságának vizsgálata. A kísérletnek megfelelő elrendezés: kék nyíl jelöli az áramlási irányt, piros nyilak a mágnes két szélét. (A) A bemutatott kísérleti paraméterek mellett mért szűrési térfogat és hatékonyság. (B) A fluidikai kamrában csapódott gyöngyök pozíciója. (C) Szűrlet átlagos mennyisége és a szűrés átlagos hatékonyság, a szűrletben detektált gyöngyök száma szerint. (D, E)

Vizsgáltam a mágnes orientáció jelentőségét, és az áramlási sebesség szerepét (0,5 – 1 – 2 $\mu\text{l/s}$) a mágneses csapódás hatékonyságra. A szűréshez a Dynabeads által forgalmazott, M-270 Streptavidin borított, 2,8 μm átmérőjű gyöngyöket alkalmaztam az eredeti $6-7 \times 10^8$ db/ml koncentrációt 0,05 %-os koncentrációban PBS-ben hígítva. A mikrofluidikai rendszer csapódási szakasza (hossza ~ 7 mm, szélessége ~ 2 mm) hosszabb az alkalmazott neodímium mágnesnél (lásd 56. A ábra). Az $5 \times 5 \times 5\text{mm}^3$, N48 mágnes remanenciája (Br) 1380-1420 mT volt, a mágnes a kamra elején rögzítettem, az áramlási irányra merőleges észak-déli pólussal [169]. A mérés során vizsgáltam a gyöngyök koncentrálódásának, csapódódásának pozícióját a csatornában, az átszűrt minta mennyiségét, valamint annak összetételét, 10 perces szűrési időt alkalmazva. Szűrés

hatékonyságát a mágneses gyöngyök jelenlétét Bükker kamrában (DHC-N01) vizsgáltam összevetve a mérés előtti keverék gyöngytartalmával.

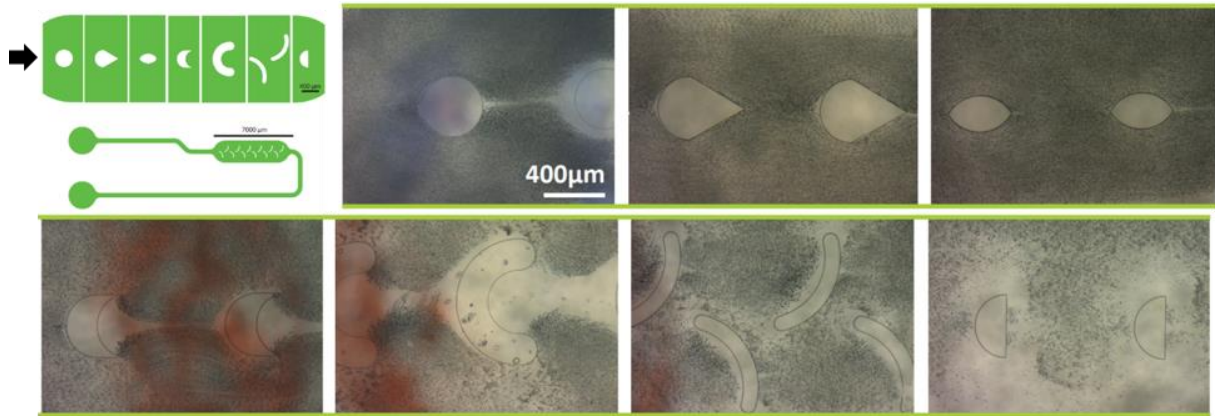
Ahogy az az 56. E ábrán látszik, adott csatornamagasság (50 vagy 25 μm) esetén az áramlási sebesség emelésével (0,5 - 2 $\mu\text{l/s}$) a mágnes gyöngyök csapdázásának hatékonysága romlik. Tapasztalatok alapján a nagyobb áramlási sebesség nagyobb célminta veszteséggel jár – a szűrletben egyre több gyöngy jelenik meg, ez különösen szembetűnő a kisebb csatornamagasságoknál (25 μm), ahol a szűrés hatékonysága mindössze 33 % volt. Az 56. C ábrán a teljes fluidikai kamra látható, a mágnes helyzetét piros nyilakkal jelöltem – a mágnes illesztése nem mindig tökéletesen a fluidika elejéhez képest. A csapdázott gyöngyök eloszlása mutatja, hogy 2 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség mellett jórészt az utolsó oszlop körül gyülemlettek fel, vagy már a mágnesen is túlsodrótak a részecskék, így egy részük átjutott a szűrletbe. Ez a jelenség a 25 μm magas csatornában alacsonyabb áramlási sebességek mellett is jellemző volt a nagyobb áramlási sebességek miatt, de ekkor még a csapdázási hatékonyságát nem rontotta jelentős mértékben.

A bemutatott elrendezésben az 50 μm magas kamrán 2 $\mu\text{l/s}$ térfogatáram mellett 10 perc alatt közel 1 ml mintát sikerült átszűrni, mely 99,6%-os hatékonysággal csapdázta a mágneses gyöngyöket. Ugyanebben a fluidikában 1 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebességek mellett is majdnem 0,5 ml szűrletet kaptam 100 %-os szűrési hatékonysággal. A mérések során megfigyeltem, hogy a gyöngyök aggregációja, befolyásolhatja a szűrés hatékonyságát.

Az előzetes eredmények rávilágítottak, hogy a csatornarendszerben kialakuló lokális sebességek nagyban befolyásolják a mágneses csapdázás hatékonyságát. Céлом tehát a nagyobb térfogatáramlási sebességek mellett a lokális csapdázás hatékonyságának növelése volt. Így későbbiekben 25 μm magas csatornában 1 $\mu\text{l/s}$ térfogatáramlási sebesség mellett teszteltem a különböző mikrostruktúrák, oszlopok (kör, körcikk, lencse, félkör, C-alak, fektetett U-alak, és periodikus ívsor) gyöngycsapdázásra gyakorolt hatását. Ezekhez a mérésekhez már a teljes kamrát lefedő mágnest alkalmaztam: $10 \times 4 \times 2 \text{ mm}^3$, N52, melynek remanenciája: 1430-1480 mT [169]. Az elkészült mikrofluidikai egységekben megvizsgáltam, hogy az az oszlopok körül kialakuló hidronamikai viszonyok milyen hatást gyakorolnak a felületen csapdázott gyöngypopuláció mintázatára (lásd 57. ábra). A mikroszkópos felvételek a csapdázási kamra teljes hosszában készültek, az így kapott képeket összevettem véges elem modellek eredményeivel. A mérési idő 10 perc volt.

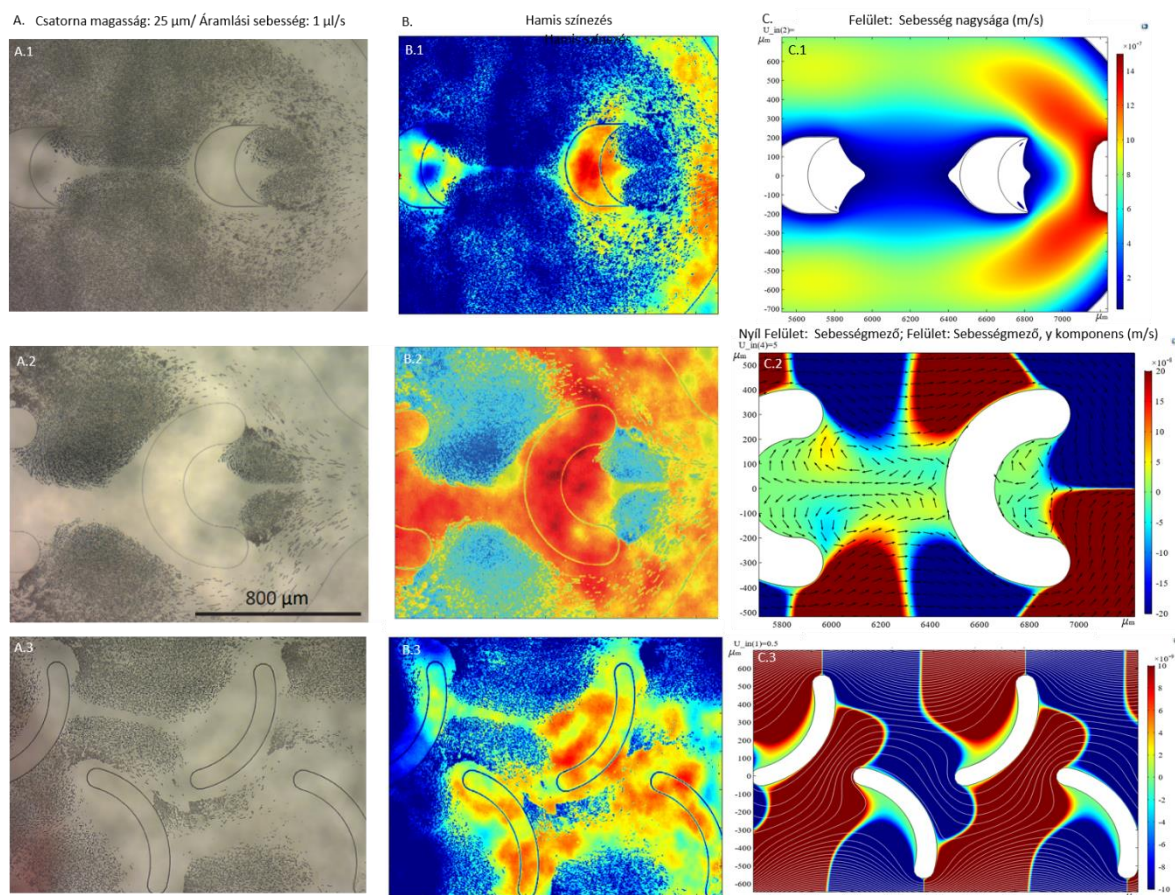
6.4.2 Kísérleti és szimulációs eredmények összehasonlítása

A 25 μm magas kamrában, 1 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség mellett vizsgáltam a gyöngyök csapdázódásának mintázatát. A teljes csatorna felületét lefedő mágnes alkalmazásával az áramvonalas oszlopok környékén, (kör, körcikk és lencse) egyenletes gyöngy csapdázódást tapasztaltam (57. ábra). A C-alakú, a fektetett U-alakú és félkör alakú oszlopok esetén az oszlopok áramlási iránnyal ellentétes oldalán nem tapasztaltam a gyöngyök csapdázást, ami lokálisan megnövekedett áramlási sebességre utal. A periodikus ívek közelében lokális dúsulást tapasztaltam.



57. ábra: Mágneses csapdázás 25 μm magas fluidikában 1 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség mellett az oszlopalak változtatásával. Mágnes: 10 x 4 x 2 mm^3 , N52. Oszlopalak (balról jobbra): kör, körcikk, lencse, C-alak, fektetett U-alak, periodikus ívsor, félkör. Az áramlási irányt nyíl jelöli.

A kísérleti eredményeket összevettem végeelem (COMSOL) szimulációk eredményeivel, melyek a mikrostruktúrák körül kialakuló sebességteret reprezentálják. Az 58. B. ábrán a mikroszkópos felvételek hamis színezésével jelöltem a csapdázódott gyöngyöket: kézzel azokat a területeket ahol a gyöngyök csapdázódtak, vörössel pedig azokat, ahol nem volt detektálható mágneses gyöngy. A színezés kiemeli a csapdázott gyöngyök eloszlása és a modellezett sebességtér közötti hasonlóságot a numerikusan számolt sebességek esetén C oszlopalknál (58. C.1 ábrán) kézzel jelöltem az alacsonyabb, pirossal a magasabb lokális abszolút áramlási sebességeket; a fektetett U és periodikus ívsor oszlopoknál a színek már az y komponens szerinti sebességmező irányultságát jelzi kézzel a lefelé, pirossal a felfelé elhajló áramlási iránnyal (58. C.2 és C.3 ábrán). Látható, hogy alacsonyabb áramlási sebességek esetén, vagy olyan áramlási jelenségeknél – például örvények esetén – számíthatunk intenzívebb gyöngy csapdázódásra, ahol a részecske hosszabb időt tölt a mágnes felett, és így több ideje van, hogy a mágneses tér indukálta vertikális elmozdulás során elérje a csatorna alsó falát.



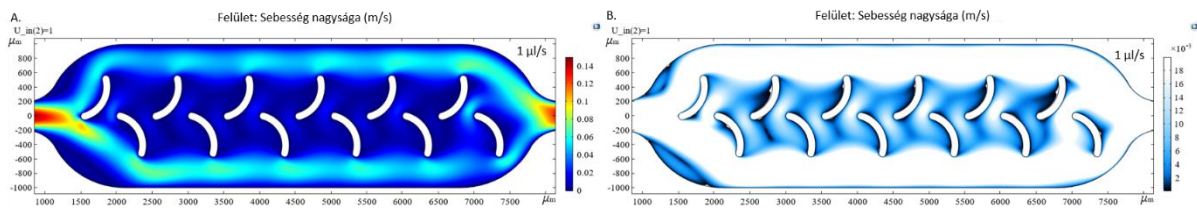
58. ábra: Mérési eredmények összehasonlítása végelelem modellel. Mikrogyöngyök mágneses csapdázása 25 μm magas fluidikában 1 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség mellett (A): C, fektetett U és periodikus ív alakú oszlopok körül. A kísérletek felvételeinek hamis színezése: kék – csapdázott gyöngy, piros – gyöngy hiánya (B). Végelelem modellel számolt áramlási sebesség eloszlás a struktúrák körül (C.); kék – alacsonyabb, piros – magasabb áramlási sebességeket jelöli a C alakú oszlopstruktúránál (C.1); a sebességmező y komponense szerint kék - a lefelé, piros - a felfelé mutató sebességmezőket jelöli a fektetett U (C.2) és periodikus ív alakú oszlopok (C.3) esetén.

A C alakú oszlopstruktúra esetén a lokálisan kialakuló alacsonyabb áramlási sebesség javítja a mágneses csapdázás hatékonyságát az oszlopok közötti térben. Emellett megfigyelhető, hogy az áramvonalak módosulása miatt a részecskék hosszabb időt töltenek a mágneses téreben, ami a vertikális irányú elmozdulásukat növeli.

A fektetett U alakú oszlopok speciális alakja miatt az alakzatok mögött örvénylő áramvonalak kialakulása detektálható, így gyöngyök szintén nagyobb utat tesznek meg ebben a térrészben, így nagyobb számban csapdázódtak, mint a csatorna többi területén. Az 58. ábra szimulációs eredményeket demonstráló képen a felfelé mutató áramlást piros színnel, a lefelé mutatót kék színnel jelöltem, amelyek jó reprezentálják az örvények kialakulását. Az U alakú oszlop végeinél a csatorna közepe felé mutató áramlási vonalak mentén egy szimmetrikusan forgó örvény kialakulását mutatják, ezzel lassítva a gyöngyök továbbhaladását és elősegítve azok csapdázódását.

A periodikus ívekből álló oszlopok (58. C.3 ábra) hasonló módon növelték az adott térrészben a gyöngyök tartózkodási idejét oly módon, hogy a teljes csatorna keresztmetszet mentén, az oszlop görbületének iránya szerint a csatorna szélei felé (felfelé – pirossal, lefelé – kékkel jelölve) vezetik az áramlás irányát.

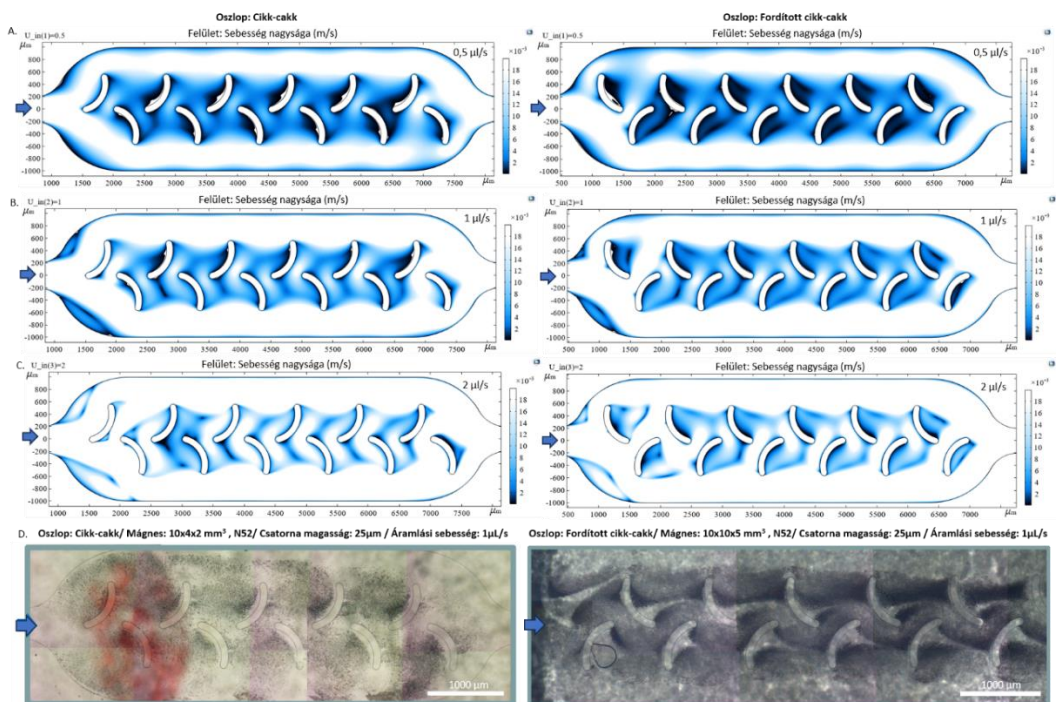
A tapasztalatok alapján FEM szimulációval becsülhető a mágneses gyöngy csapdázódásának mintázata és kiterjedése (lásd 59. ábra) 0 – 0,14 m/s áramlási sebesség értékek között.



59. ábra: A periodikus ív alakú oszlopstruktúrák között kialakuló sebességprofilja 0 – 0,14 m/s (A) és 0,0001 – 0,02 m/s (B) áramlási sebességek között ábrázolva. A (B) ábrán kék színnel látható az a tartomány ahol mágneses gyöngy csapdázódás várható.

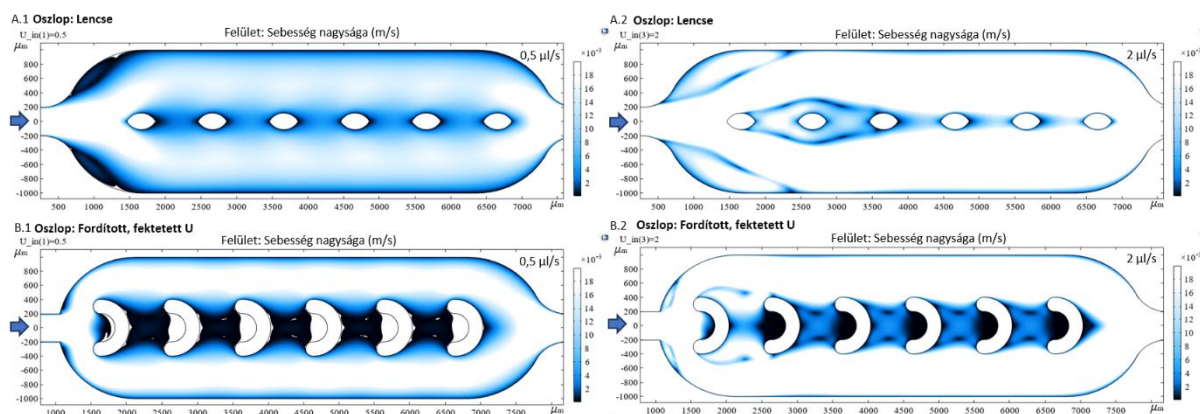
A továbbiakban az oszlopok orientációjának megváltoztatásával is vizsgáltam a csapdázás hatékonyságát, kiemelve a korábbi csapdázási eredmények alapján jobban teljesítő periodikus ív alapú oszlopstruktúrát. A 59. ábrán látható, hogy az eredetileg tervezett periodikus ívelt oszlopok megfordításával nagyobb kiterjedésű lokális gyöngy koncentrációt várhatunk az oszlopok görbületénél 0,5 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség esetén.

A két elrendezésben (60. ábra) az áramlási sebességeket 0,5 - 1 - 2 $\mu\text{l/s}$ között változtatva látható, hogy a 25 μm magas csatornában a szimulációk jó közelítéssel adják meg kísérletekben tapasztalt gyöngy kitapadás mértékét. 1 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség esetén, 25 μm magas csatornában megismételtem a mérést mindkét oszlopkonfiguráció mellett. A fordított orientáció esetén ennél az áramlási sebesség esetén is jobb gyöngy-dúsulást volt tapasztalható, mint az eredeti oszloporientációval. 2 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebességek mellett az oszlopok között már a csapdázott gyöngyök ritkulása várható. A kísérletek megerősítették, hogy az áramlási profilok szimulációs elemzésével meglehetősen jó közelítéssel becsülhető a mágneses gyöngyök kitapadása.



60. ábra: Periodikus ívelt oszlopok orientációjának hatása a mágneses gyöngyök csapdázódására. A 25 μm magas mikrostruktúrák körül kialakuló sebességeloszlás 0,5 $\mu\text{l/s}$ (A), 1 $\mu\text{l/s}$ (B) és 2 $\mu\text{l/s}$ (C) áramlási sebességek mellett. Az áramlási sebességeloszlás alapján várt csapdázott gyöngyeloszlás nagyban megfelel a kísérleti eredményeknek, amelyeket a 25 μm magas csatornában, 1 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség mellett tapasztaltam. (D)

A korábbiakban alkalmazott lencse alakú oszlopok esetén viszonylag egyenletes gyöngykitapadást volt tapasztalható alacsony ($1 \mu\text{l/s}$) áramlási sebességek mellett (61. ábra A.1). A szimulációk eredményei arra utalnak, hogy az ilyen áramvonalas oszlopok esetén az áramlási sebesség emelésével jelentősen romlik a mágneses csapdázás hatékonysága. (61. A.2 ábra). Ezzel ellentétben, speciális oszlopok használatával – mint a fektetett U alak (61. B.1-2) – a sebesség emelésével javuló tendenciát mutat a gyöngyök lokális csapdázási hatékonysága.



61. ábra: Szimulált sebességtér alapján várható gyöngykitapadás lencse alakú (A) és fordított, fektetett U alakú (B) oszlopstruktúrák esetén, $0,5 \mu\text{l/s}$ és $2 \mu\text{l/s}$ áramlási sebességek mellett.

6.4.3 A mágneses szeparáció hatékonysága mikrofluidikai környezetben

A mágneses csapdázás hatékonyságának morfológia és áramlási sebesség függését vizsgáltam mérések és végeelem szimulációk segítségével. Megállapítottam, hogy alacsony csatornamagasságok esetén a magnetoforetikus csapdázási folyamatok érzékenyebbek az áramlási sebesség változtatására. Vizsgáltam a speciális mikroszerkezetek körül kialakuló sebességtér hatását a lokális csapdázási hatékonyságra, és megállapítottam, hogy a sebesség lokális csökkentése, illetve az áramlási profil módosítása alkalmas a mágneses csapdázás hatékonyságának növelésére. Megmutattam, hogy olyan mikroszerkezetek körül, ahol megnövekszik a részecskék megtett útja – például transzverzális vagy örvénylő pályavonalak kialakulása miatt – a részecskék nagyobb arányban érik el a csatorna alsó, csapdázó felületét.

Végelem modell felépítésével megmutattam, hogy a numerikusan számolt sebességtér alkalmas a mágneses részecskék csapdázási helyzetének és lokális csapdázási hatékonyságának előrejelzésére – vagyis a modell alkalmas magnetoforetikus szeparációs szerkezetek digitális ikerként történő alkalmazására. Az előbbieken alkalmazott oszlopok kombinálásával, és az oszlopközök távolságának beállításával olyan mintázatot sikerült kialakítani, mely a szimulációs eredmények alapján nagyobb áramlási sebességek ($2 \mu\text{l/s}$) esetén is hatékonyabb csapdázásra lehet képes.

A módszer előnyeként sorolható fel, hogy az aktív szeparálási módszerek közül ennél érhető el a legnagyobb áramlási sebesség mellett effektív szegregálás, ennek a módszernek a legnagyobb az átteresztőképessége, nem hajlamos dugulásra. Az áramlási sebességek, áramlási nyomvonalak vizsgálatával, a gyöngyök ülepedésének követésével jó megközelítéssel becsülhető a mágneses csapdázás helye és mértéke végeelem modellekkel is. Az alkalmazott médium összetételére, annak

fizikai paramétereire csak kis mértékben érzékeny, ellentétben a korábban bemutatott szegregációs megoldásokkal. Hátránya azonban, hogy a minta előkezelést igényel, a célminta-specifikus antitestek alkalmazása megnöveli az assay árát, és kezelési idejét

Összehasonlításképpen látható, hogy a magnetoforetikus jelenségek vizsgálata során 50 μm magas fluidikai egységben 2 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség esetén 10 perc alatt körülbelül 1049 μl szűrlethez jutottam 99,6 %-os szűrési hatékonyság elérésével – \varnothing 2,8 μm gyöngy méret és $\sim 3,3 \times 10^7$ db/ml koncentráció mellett. Ehhez képest az oszlopos elrendezésű, 50 μm főcsatorna és 10 μm rosta magassággal rendelkező keresztáramlásos szűrő geometria esetén alacsonyabb, 0,5 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség mellett, 30 perc szűrés idővel jutottam 650 μl mintához $\sim 77\%$ -os szűrési hatékonysággal – \varnothing 1,97 μm gyöngy méret és $\sim 2,08 \times 10^7$ db/ml koncentráció mellett. Amennyiben a főcsatorna – rosta magassága: 50 μm - 5 μm volt, a hatékonyság leesett $\sim 42\%$ -ra. Természetesen nem mindegyik módszer hasonlítható ilyen egyszerűen össze a változatos paraméterek miatt, de jól szemlélteti, hogy gyors tesztek esetén a kritikus szűrési idő, és a szűrési hatékonyság nagy varianciával rendelkezik.

7. Összefoglalás

Kutatómunkám során olyan mikrofluidikai rendszerben kivitelezhető passzív és aktív manipulációs elven működő részecskeszeparációs megoldásokat vizsgáltam, mely célja elsősorban alakos elemek, célsejtek szegregálása a minta oldatból – például vizeletből. A fejlesztett és vizsgált szerkezetek alkalmazása szempontjából fontos szempont a későbbi diagnosztikai rendszerbe történő integrálhatóság, a hordozhatóság, melynek kiemelt aspektusa a mikrofluidikai rendszer geometriai és anyagszerkezeti tulajdonságainak tervezése és vizsgálata – az ipari alkalmazásokkal összhangban. A RUBA (Rapid Urine Bacteria Analyzer), azaz gyors húgyúti baktérium elemző mérőeszköz fejlesztése során a közvetlen cél baktériumok ($\varnothing < 4 \mu\text{m}$) szűrése és az érzékelő területen történő pozícionálása, lokalizálása volt.

Olyan mikrofluidikai mintaelőkészítő szerkezeteket hoztam létre, melyek alkalmasak a baktériumok mérettartományán kívül eső, a későbbi mérési feladatokat esetlegesen befolyásoló alakos elemek szűrésére, elválasztására, illetve megvizsgáltam a különböző méretű alakos elemek érzékelő területen történő koncentráálásának lehetőségeit. Az elválasztási módszerek és szerkezetek alapparamétereit elsősorban méretbeli korlátozások mentén terveztem, ezért figyelembe vettem a választott megoldások áteresztőképességét, hatékonyságát, robusztusságát, más műveleti egységgel való összeépíthetőségét, integrálhatóságát is. A kialakított mikrofluidikai egységek esetén vizsgáltam azok geometriai paramétereiktől függő teljesítőképességét, illetve javaslatot tettem az optimális morfológiai és működési paraméterekre. Vizsgálataim négy szeparálási módszerre tértek ki az alkalmazott kísérleti eljárások során, melyekhez megfogalmazott tézispontokat a fejezetben listázom.

7.1 Determinisztikus oldal irányú eltérítés

I.1. TÉZIS

Hat különböző (négyzet, kör, és különböző orientációjú egyenlő szárú és derékszögű háromszög alapú hasáb) oszlopgeometriával rendelkező DLD mikrofluidikai szerkezet szeparációs hatékonyságát összehasonlítva megállapítottam, hogy az oszlopok között kialakuló sebesség- és nyomáseloszlás jelentősen befolyásolja a részecskék oszlopmatrixban felvett pályavonalait – ezáltal módosítva az elrendezésre jellemző elméleti kritikus átmérőt (D_c). Az általam tervezett: $90\mu\text{m}$ oszloptávolsággal és $40\mu\text{m}$ résmérettel, valamint $2,86^\circ$ -os eltolási paraméterrel rendelkező DLD szerkezetek közül a szimmetrikus négyzet alapú oszlopokat tartalmazó adja a legjobb, $\sim 1000\mu\text{m}$ szeparációs eltérítést a vizsgált $20,4\mu\text{m}$ átmérőjű részecskékre, 20 oszlopperiódust figyelembe véve.

Tudományos közlemény Po3

I.2. TÉZIS

Megállapítottam, és *E. coli* baktériumok viselkedésén keresztül is demonstráltam, hogy az erős orientációval rendelkező (pl. derékszögű háromszög alapú) oszlopok által indukált aszimmetrikus sebességtér jelentősen módosítja a részecskék pályavonalait, lerontva ezzel a laterális migráció szeparációs határfokát. A megadott geometriai paraméterekkel jellemezhető aszimmetrikus (különböző orientációjú derékszögű háromszög alapú) oszlopokat tartalmazó DLD mikrofluidikai rendszerekben a mintaoldal laterális kiterjedése a bemeneti, fókuszált értékének 255 - 363 %-ára szélesedik, így az alakos elemek nem szeparálódnak ettől a tartománytól.

Tudományos közlemény: Po3

Po3 Anita, Bányai; Petra, Hermann; Orsolya, Hakkel; Zoltán, Hajnal; Péter, Fürjes; Shape design dependent performance of DLD (deterministic lateral displacement) based particle separation systems - FEM modelling and validation (2019) SelectBio, Lab-on-a-Chip and Microfluidics Europe 2019, Rotterdam 2019.06.18-19.

7.2 Keresztáramlásos szűrés

II.1. TÉZIS

Megállapítottam, hogy a nagyobb (szűrőcsatorna / főcsatorna) magasságarányú szerkezetek jobbak a szűrési hatékonyság szempontjából: hasonló mennyiségű célrészecske kinyerése mellett jelentősen csökkenthető a nagyobb részecskék áteresztése, javítható a szűrlet tisztasága. Az 1,97 μm átmérőjű részecskék mellett megjelenő 6,08 μm átmérőjű részecskék száma 79,5%-kal, illetve 69,6%-kal csökkent az 1:10 magasságarányú (5 μm / 50 μm és 10 μm / 100 μm) szerkezetekben, az 1:5 magasságarányúakhoz (5 μm / 25 μm és 10 μm / 50 μm) képest. **Tudományos közlemény: Po2**

II.2. TÉZIS

Megállapítottam, hogy állandó tömegáram mellett a kisebb keresztmetszetű főcsatornában kialakuló megnövekedett lokális áramlási sebesség miatt romlik a szűrés hatékonysága. Bizonyítottam, hogy a passzív szeparációs szerkezetként vizsgált duzzasztógát típusú keresztáramlásos szűrő alkalmas kisméretű sejtek, E. coli baktériumok előszűrésére; azonban a szűrés hatékonysága függ a mintában található nem specifikus alakos elemek jelenlététől. A mintába kevert 6,08 μm és 15,8 μm átmérőjű gyöngyök mellett az átszűrt E. coli baktériumok hozama ~35 %-kal csökkent. A szűrési mérettől nagyobb elemek miatt a szűrő felületen kialakuló szűrési tömörülési réteg jelentősen akadályozza a célsejtek átjutását a szűrletbe. **Tudományos közlemény: Po2**

Po2 Anita, Bányai; Máté, Varga; Péter, Fürjes; **Filtration efficiencies of crossflow type microfilters for E. coli separation** (2022) Mátrafüred International Meeting on Chemical Sensors 2022 – Visegrád, Hungary, 2022.06.13. (2022. június 12-17.)

7.3 Laterális fókuszálás

III.1. TÉZIS

Megállapítottam, hogy a csatorna magasságának csökkentésével ($50\ \mu\text{m} \rightarrow 25\ \mu\text{m}$) jelentősen javítható a kisebb méretű gyöngyök fókuszálásának hatékonysága, és a részecskék pozíciójának méret szerinti elkülönítése. A leghatékonyabb $25\ \mu\text{m}$ magassággal és $50\ \mu\text{m}$ kritikus keresztmetszettel rendelkező mikrofluidikai csatornában, $1\ \mu\text{l/s}$ térfogatáramlási sebesség mellett, a $15,8$ és $4,8\ \mu\text{m}$ átmérőjű részecskék esetén a kimeneti keresztmetszet több, mint $20\ \%$ -ának megfelelő laterális fókuszpozíció távolság érhető el. **Tudományos közlemény: P2, P3**

III.2. TÉZIS

Kísérletekkel bizonyítottam, hogy az általam alkalmazott periodikusan változó keresztmetszetű, aszimmetrikus kanyarulatokból felépülő mikrofluidikai csatornában a magasság jelentős csökkentésével javítható a célsejt *E. coli* baktériumok koncentrációs határfoka is. $15\ \mu\text{m}$ magas mikrofluidikai csatornában, $1\ \mu\text{l/s}$ -os térfogattáramnával a $300\ \mu\text{m}$ széles csatorna keresztmetszetének $77\ \%$ -ára koncentrálódik a sejtpopuláció. **Tudományos közlemény: P1**

III.3. TÉZIS

Kihasnálva az alkalmazott mikrofluidikai rendszer periodikusságát, ciklikusan ismétlődő végeelem modellt javasoltam, amelynek kimeneti paramétereit (sebességtér, részecske pályavonalak) ismét a bemeneti oldalon definiálva, tetszőleges hosszúságú mikrofluidikai rendszer viselkedése modellezhető moderált erőforrásigény mellett, annak legyártása nélkül, csupán digitális ikrének definiálásával. Legyártott fluidikai rendszerben vizsgálva és összehasonlítva célsejtek és polisztirol gyöngyök áramlástanai viselkedését, meghatároztam a változatos morfológiájú *E. coli*, vörösvértes, élesztőgomba, és HeLa sejtekkel ekvivalens rigid gömb átmérőket: $1\text{--}2\ \mu\text{m}$, $5\text{--}6\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m}$, $15\text{--}17\ \mu\text{m}$. Végeelem szimulációk numerikus eredményeit összevetve a kísérleti eredményekkel megállapítottam, hogy a modell jó eredményeket ad a laterális pozíció vonatkozásában, de annak eloszlását csak nagyobb hibahatárral képes számítani. **Tudományos közlemény: P1**

- P1 Bányai, Anita ; Farkas, Enikő ; Jankovics, Hajnalka ; Székács, Inna ; Tóth, Eszter L. ; Vonderviszt, Ferenc ; Horváth, Róbert ; Varga, Máté ; Fürjes, Péter **Dean-Flow Affected Lateral Focusing and Separation of Particles and Cells in Periodically Inhomogeneous Microfluidic Channels** SENSORS 23 : 2 Paper: 800 , 19 p. (2023); <https://doi.org/10.3390/s23020800>
- P2 Bányai, Anita ✉ ; Tóth, Eszter Leelössyné ; Varga, Máté ; Fürjes, Péter **Geometry-Dependent Efficiency of Dean-Flow Affected Lateral Particle Focusing and Separation in Periodically Inhomogeneous Microfluidic Channels** SENSORS 22 : 9 Paper: 3474 , 13 p. (2022); <https://doi.org/10.3390/s22093474>
- P3 Bányai Anita, Bató Lilia, Leelössyné Tóth Eszter, Varga Máté, Fürjes Péter* **Áramlástanai jelenségek mikroszkopikus mérettartományban – mikrofluidikai** Fizikai Szemle/ LXXIII. ÉVFOLYAM, 11. (828.) SZÁM

7.4 Mágneses szeparáció

IV.1. TÉZIS

Megállapítottam, hogy a sebesség lokális csökkentése, illetve az áramlási profil módosítása alkalmas a mágneses csapdázás hatékonyságának növelésére. Megmutattam, hogy olyan mikroszerkezetek körül, ahol megnövekszik a részecskék megtett útja – például transzverzális vagy örvénylő trajektóriák kialakulása miatt – a részecskék nagyobb arányban csapdázódnak a csatorna alsó felületén.

Tudományos közlemény: Po1

IV.2. TÉZIS

Végelelem modell felépítésével megmutattam, hogy a numerikusan számolt sebességtér alkalmas a mágneses részecskék csapdázási helyzetének és lokális csapdázási hatékonyságának előrejelzésére – vagyis a modell alkalmas magnetoforetikus szeparációs szerkezetek digitális ikerként történő alkalmazására.

Tudományos közlemény: Po1

Po1 Anita, Bányai; Eszter, Leelőssyné Tóth; Péter, Fürjes; **Effect of channel morphology on magnetic separation in microfluidic particle trapping** (2022) SelectBio, Lab-on-a-Chip and Microfluidics Europe 2022, Rotterdam 2022, 2022.06.20. (2022. június 20-21)

8. Eredmények hasznosíthatósága

A mikrofluidikai rendszerek olyan, jellemzően bankkártya, mikroszkóp tárgylemez vagy kisebb méretű egységek, melyek valamilyen folyadék fázisú mintát kezelnek és vizsgálnak egy zárt többnyire egyszer használatos polimer alapú kazettában. Mikrofluidikai rendszernek hívjuk őket, mert ezek a kazetták olyan csatornahálózatot tartalmaznak, amelyeknek egy vagy több dimenziója (csatorna szélesség, magasság, térfogat) mikronos tartományban mozog.

A mikrofluidikai kazetták elsődleges feladata, hogy a mérendő analitot, ami bármi lehet (pl. baktérium, fehérje, vírus, DNS, RNS stb.) egy mintából (pl. vérszérum, vizelet, ivóvíz stb.) minél nagyobb pontossággal és érzékenységgel kimutassa. Vagyis applikációs oldalról a mikrofluidikai rendszereket jellemzően valamilyen diagnosztikai vagy monitoring feladatra fejlesztik, leginkább orvosi célú felhasználásra, ahol fontos, hogy a mérést minimális mintatérfogattól, minél rövidebb idő alatt oldják meg.

Ahhoz, hogy a fent említett mérés sikeres legyen az esetek túlnyomó többségében a mérendő mintát elő kell készíteni, ez az úgynevezett mintapreparáció. A minta előkészítését a klasszikus laboratóriumi gyakorlatban manuálisan végzik, jellemzően pipettázások, kevertetések, szűrések és koncentrálások folyamata. A mikrofluidikai rendszerek céljai ezen feladatok kazettába integrált, nagy pontosságú elvégzése. Amennyiben egy mikrofluidikai rendszer már tartalmaz valamilyen szenzoregységet (pl. bioszenzor) is, ami a mérendő analit kimutatásáért felel, úgy lab-on-a-chip (LOC) rendszernek hívjuk. A LOC rendszerek tehát egy olyan integrált mintaanalitikai eszközök, melyek képesek kiváltani a bonyolult laboratóriumi műveletek sorozatát és a mérést az ellátás helyén elvégezni, legyen az akár terepen, a házi orvosi praxisban vagy a betegágy mellett. Ezek a LOC rendszerek az alappillérei a modern, nagy pontosságú point-of-care orvosi diagnosztikai eszközöknek is.

Kutatásom során a mikrofluidikai rendszerekben használatos különböző aktív és passzív részecske szeparálási és koncentrálási megoldásokat vizsgáltam. A részecske vagy analit szeparálási és koncentrálási eljárások a mikrofluidikai mintapreparációs lépések közül az egyik sarkalatosabb és legnagyobb kihívást támasztó funkciók. Számos applikációs esetben szükséges a mérendő analitot és a mérést zavaró egyéb elemeket (sejtek, törmelékek stb.) elválasztani egymástól, azért, hogy ne zavarja az analit mérését a médium „zaja”, azaz ne csökkentse számottevően a rendszer szenzitivitását és specificitását. Ilyen tipikus applikációs esetek a teljes vér vagy a vizelet szűrése, ahol a sejtes és egyéb alakos elemek (nyák, kristály, sejttörmelék stb.) jelenléte gyengítheti vagy szélsőséges esetben ellehetetlenítheti a biokémiai kölcsönhatást a detektáló ágens és analit között. Bizonyos esetekben (pl. baktériumok kimutatása vizeletből vagy vérszérumból) szükséges az analit koncentrálása a mérés előtt, ezzel növelve a rendszer szenzitivitását. Ezekhez olyan integrált mikrofluidikai megoldásokat kutattam, amelyek bizonyos peremfeltételek mentén beilleszthetők egy modern orvosi diagnosztikai eszközbe, mellőzve a készüléken kívül történő körülményes minta szűrést és centrifugálást.

Az integrált mikrofluidikai részecske elválasztási technológiák közül kiemelt figyelmet fordítottam és intenzív kutatási munkával tanulmányoztam a DLD, keresztáramlásos szűrés és a laterális részecske fókuszálási passzív elválasztási technológiákat, valamint előzetes kutatásokat folytattam a magnetoforetikus aktív elválasztási módszer tekintetében is.

Applikációs oldalról megvizsgálva az eredményeket kijelenthető, hogy a passzív elválasztási és koncentrálni technikák olyan esetekben használhatóak, amikor a mikrofluidikai kazetta működtetését nyomásvezérelt külső pumpával (fecskendő, perisztaltikus, piezo, egyéb) biztosítjuk és a megnövelt áramlási sebesség nem kritikus mérés technológiai oldalról. Erre jó applikációs példa a mikrofluidikai környezetben megvalósított sejtszámláló (cell counter), ahol nincs a rendszerben olyan aktív felület, ahova a vizsgálni kívánt sejteket immobilizálni kellene, de szükség van az analit nagy hatékonyságú és gyors elválasztására. Olyan esetekben is használhatóak a passzív elválasztási megoldások, ahol van egy dedikált szenzor zóna a mikrofluidikai kazettában, de olyan erős az analit és a felismerő ágens közötti kölcsönhatás, hogy a növelt áramlási sebesség számottevően nem csökkenti annyival a rendszer érzékenységét, mint amennyivel az elválasztási technika növeli azt, vagyis a mérleg eredménye végső soron pozitív. Erre egy jó példa a kardiovaszkuláris megbetegedések diagnosztikájában használatos gold standard szérumszékkel kimutatása (nt-proBNP, cTnI stb.).

Azonban számos olyan applikációs eset is van, ahol a megnövelt áramlási sebesség már jelentős hátrány és számottevő érzékenység csökkenést okozhat. Azokban az esetekben, ahol a mérendő analit és felismerő ágense közötti kölcsönhatás gyenge (pl. alacsony K_d értékű antitestek) vagy az azonosításra váró analit egy élő, önálló mozgásra képes, viszonylag nagy organizmus (pl. baktérium), a megnövelt áramlási sebesség rontani fogja a kimutatási határt és a hatékony elválasztás ellenére a rendszer eredő hatásfoka nem lesz elégséges (negatív mérleg). Ezekben az esetekben érdemes olyan elválasztási technológiákat keresni, ami alacsony áramlási sebesség mellett is megfelelően működik. Ilyenek az aktív elválasztási technológiák (pl. magnetofórezis), ahol valamilyen külső erőtér hatására (mágneses, elektromos, akusztikus stb.) jön létre a kívánt részecske-szeparáció. Ezen megoldások további közös előnye, hogy implementálhatóak úgynevezett autonóm mikrofluidikai rendszerekbe is, ahol a minta áramlása kapilláris erők hatására történik, így külső vezérlés nem szükséges.

Az autonóm mikrofluidikai rendszerek előnye klinikai oldalról, hogy a kazetta és a műszer között nincs fluidikai kapcsolat, így a kazetta egy önálló zárt egységet alkot, ami mérést követően eldobható. Nem kell megoldani a bonyolult és kockázatos automatikus fluidikai csatlakoztatást, a csatlakozók időszakos tisztítását, nem merül fel olyan veszély, hogy a minta kontaminálja a műszert. Azonban az autonóm fluidikák esetében a felületi feszültségek pontos beállítása, azok időbeni állandósága, a precíz, kontamináció mentes kazetta gyártás hatványozottan kritikus paraméterek.

A fenti applikációs példák jól mutatják, hogy már csak az in vitro orvosi diagnosztika iparágban számos területen szükség lehet ilyen integrált, mikrofluidika alapú passzív vagy aktív részecske elválasztási technológiákra. Az, hogy adott esetben melyik technológia az optimális, azt elsősorban a klinikai igények, másodsorban pedig a fejlesztés alatt álló rendszer határozza meg. Kutatásom ezt a döntést abban segíti, hogy bizonyos, gyakran vizsgált mikrométeres vagy nagyobb alakos elemek esetén (baktérium, vörösvértest, élesztőgomba, HeLa sejt), mikor melyik passzív vagy aktív elválasztási megoldás a célravezető adott rendszerbeállítások mentén. Mivel a vizsgálatom a PhD időszakom alatt nem volt teljeskörű, így a jövőben terveim szerint folytatni fogom ezen területek vizsgálatát.

9. Publikációs jegyzék

9.1 Tézisek alapjául szolgáló publikációk

- P1 Bányai, Anita; Farkas, Enikő; Jankovics, Hajnalka; Székács, Inna; Tóth, Eszter L.; Vonderviszt, Ferenc; Horváth, Róbert; Varga, Máté; Fürjes, Péter **Dean-Flow Affected Lateral Focusing and Separation of Particles and Cells in Periodically Inhomogeneous Microfluidic Channels** SENSORS 23 : 2 Paper: 800 , 19 p. (2023); <https://doi.org/10.3390/s23020800>
- P2 Bányai, Anita ✉; Tóth, Eszter Leelőssyné; Varga, Máté; Fürjes, Péter **Geometry-Dependent Efficiency of Dean-Flow Affected Lateral Particle Focusing and Separation in Periodically Inhomogeneous Microfluidic Channels** SENSORS 22 : 9 Paper: 3474 , 13 p. (2022); <https://doi.org/10.3390/s22093474>
- P3 Bányai Anita, Bató Lilia, Leelőssyné Tóth Eszter, Varga Máté, Fürjes Péter* **Áramlástanai jelenségek mikroszkopikus mérettartományban – mikrofluidikai** Fizikai Szemle/ LXXIII. ÉVFOLYAM, 11. (828.) SZÁM

9.2 Konferencia publikációk

- Po1 Anita, Bányai; Petra, Hermann; Orsolya, Hakkel; Zoltán, Hajnal; Péter, Fürjes; **Shape design dependent performance of DLD (deterministic lateral displacement) based particle separation systems - FEM modelling and validation** (2019) SelectBio, Lab-on-a-Chip and Microfluidics Europe 2019, Rotterdam 2019.06.18-19
- Po2 Anita, Bányai; Máté, Varga; Péter, Fürjes; **Filtration efficiencies of crossflow type microfilters for E. coli separation** (2022) Mátrafüred International Meeting on Chemical Sensors 2022 – Visegrád, Hungary, 2022.06.13. (2022. június 12-17.)
- Po3 Anita, Bányai; Eszter, Leelőssyné Tóth; Péter, Fürjes; **Effect of channel morphology on magnetic separation in microfluidic particle trapping** (2022) SelectBio, Lab-on-a-Chip and Microfluidics Europe 2022, Rotterdam 2022, 2022.06.20. (2022. június 20-21)

9.3 Egyéb publikációk

- P4 Farkas Enikő, Tarr Robert, Gerecsei Tamás, Saftics András, Kovács Kinga Dóra, Stercz Balázs, Domokos Judit, Péter Beatrix, Kurunczi Sándor, Székács Inna, Bonyár Attila, Bányai Anita, Fürjes Péter, Ruszkai-Szaniszló Szilvia, Varga Máté, Szabó Barnabás, Ostorházi Eszter, Szabó Dóra, Horváth Róbert **Development and In-Depth Characterization of Bacteria Repellent and Bacteria Adhesive Antibody-Coated Surfaces Using Optical Waveguide Biosensing** BIOSENSORS 12 : 2 Paper:56,20p. (2022); <https://doi.org/10.3390/bios12020056>
- P5 Petrovszki, Dániel ✉; Valkai, Sándor; Gora, Evelin; Tanner, Martin; Bányai, Anita; Fürjes, Péter; Dér, András **An integrated electro-optical biosensor system for rapid, low-cost detection of bacteria** MICROELECTRONIC ENGINEERING 239 Paper: 111523 , 9 p. (2021); <https://doi.org/10.1016/j.mee.2021.111523>
- Po4 Enikő, Farkas; Robert, Tarr; Tamás, Gerecsei; András, Saftics; Kinga, Dóra Kovács; Balázs, Stercz; Judit, Domokos; Beatrix, Péter; Sándor, Kurunczi; Inna, Székács; Attila Bonyár; Anita Bányai; Péter Fürjes; Szilvia Ruszkai-Szaniszló; Máté Varga; Barnabás Szabó; Eszter Ostorházi; Dóra Szabó; Róbert Horváth; **Label-free optical biosensor method for detailed analysis of bacteria repellent and adhesive surfaces** (2022) Regional Biophysics Conference

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Fürjes Péternek a lehetőségért, hogy a Mikrorendszerek Laboratóriumában dolgozhattam; a folyamatos támogatásért, a közös munkáért, szakmai útmutatásért; a fejlődési lehetőségért a folyamatosan bővülő eszközparkban, valamint a példamutatásáért mind szakmai hozzáértésben, elszántságban, és kitartásban.

Köszönettel tartozom Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet igazgatóinak, amiért lehetőséget adtak, hogy az intézetben folytassam tanulmányaimat, bekapcsolódva a kutatómunkába és használva a hihetetlenül gazdag és egyedülálló infrastruktúrát.

Köszönöm a Mikrorendszerek Laboratóriumban munkatársaimnak mind szakmai, mind baráti támogatását és külön hálával tartozom Leelóssyné Tóth Eszternek a COMSOL szimulációk terén nyújtott segítségével, Eröss Magdolnának, Pajer Margitnak és Sík Zsuzsannának a tisztáteri támogatásukért.

Köszönettel tartozom az Óbudai Egyetem Anyagtudományok és Technológiák Doktori Iskola vezetőjének Dr. Réger Mihálynak, hogy a doktori iskolába fogadott és támogatta kutatásaimat. Valamint hálámat szeretném kifejezni azoknak az egyetemi kollégáimnak és tanárainak, akik támogatták tanulmányaimat, előrehaladásomat, és szakmai fejlődésemet az évek során.

Szeretném megköszönni a 77 Elektronika Kft. vezetőinek, hogy A Kooperatív Doktori Program keretében támogatták felvételemet intézményükbe. Külön köszönettel tartozom Varga Máténak, ipari konzulensemnek szakmai útmutatásáért és támogatásáért; valamint köszönöm kollégáimnak, támogatásukat és szakmai tanácsaikat a közös projektek során.

Köszönetet szeretnék mondani a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak, amiért lehetővé tették részem vételemet a Kooperatív Doktori Programjukban (KDP-2020), mely nem csak anyagilag, szakmailag is támogatták előrehaladásomat, fejlődésemet és elhelyezkedésemet az ipari.

Köszönetet szeretnék mondani az egyes szervezeteknek a futó projektek támogatásáért, mely lehetővé tette a mikrofluidikai kutatások előrehaladását: Magyar Nemzetgazdasági Minisztériumnak a VEKOP-2.2.1-16-2017-00001 támogatásért, az Innovációs és Technológiai Minisztériumnak és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapnak (NKFIA) az INBIOM TKP2021-EGA-04-en, és KKP 129936 támogatást, és a kutatói projekteken együttműködő tagok munkáját.

Köszönetet szeretném mondani családomnak, szüleimnek és testvéreimnek, amiért végig támogattak, bíztattak és szorítottak nekem tanulmányaim elvégzéséhez.

Bár név szerint nem tudok megemlíteni mindenkit e rövid fejezetben, de szeretném megköszönni minden mentoromnak, tanáromnak, diáktársamnak, volt és leendő kollégáimnak, barátaimnak mind azt a támogatást, útmutatást, baráti jobbot, mely hozzájárult fejlődésemmel, előrehaladásomhoz, és mely végül a kutatói pálya irányába terelt az évek során.

11. Irodalomjegyzék

- [1] N. Convery és N. Gadegaard, „30 years of microfluidics”, *Micro Nano Eng.*, köt. 2, o. 76–91, márc. 2019, doi: 10.1016/j.mne.2019.01.003.
- [2] R. G. Sweet, „High Frequency Recording with Electrostatically Deflected Ink Jets”, *Rev. Sci. Instrum.*, köt. 36, sz. 2, o. 131–136, febr. 1965, doi: 10.1063/1.1719502.
- [3] G. M. Whitesides, „The origins and the future of microfluidics”, *Nature*, köt. 442, sz. 7101, Art. sz. 7101, júl. 2006, doi: 10.1038/nature05058.
- [4] B. Szabó, A. Borbíró, és P. Fürjes, „Lab-on-a-chip rendszerek a betegágy melletti diagnosztikában”, *Orv. Hetil.*, köt. 156, sz. 52, o. 2096–2102, dec. 2015, doi: 10.1556/650.2015.30326.
- [5] „The top 10 causes of death”. Elérés: 2023. május 15. [Online]. Elérhető: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- [6] „Microfluidics Market Size, Global Industry Trend Analysis and Forecast 2023-2030”. Elérés: 2023. május 2. [Online]. Elérhető: <https://www.linkedin.com/pulse/microfluidics-market-size-global-industry-trend-analysis-rahul-dhabe>
- [7] „Microfluidics Market Size, Share, Growth & Demand Analysis Report By Material (Glass, Silicone, Polymer, and Others) By Product (Flow and pressure sensors, Micropumps, Microneedles, Microfluidic chips and Other components) By (Pharmaceutical and Biotechnology research, Drug delivery systems, Point-of-Care Testing (POCT) diagnostics, Clinical Diagnostics, and Other) Forecast Period 2022-2030”. Elérés: 2023. május 2. [Online]. Elérhető: <https://www.marketbusinessinsights.com/microfluidics-market-39295.html>
- [8] „Microfluidics Market Revenue Trends and Growth Drivers”, MarketsandMarkets. Elérés: 2023. május 2. [Online]. Elérhető: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/microfluidics-market-1305.html>
- [9] R. and M. Ltd, „Global Microfluidics Technology Market 2022-2026”. Elérés: 2023. május 2. [Online]. Elérhető: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5514865/global-microfluidics-technology-market-2022-2026>
- [10] „In vitro Diagnostics Market Size, Share & Trends, 2029”. Elérés: 2023. május 9. [Online]. Elérhető: <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/in-vitro-diagnostics-ivd-market-101443>
- [11] „COVID-19 Diagnostics Market Size, Share | Global Report [2029]”. Elérés: 2023. május 9. [Online]. Elérhető: <https://www.fortunebusinessinsights.com/covid-19-diagnostics-market-103291>
- [12] R. and M. Ltd, „Lab-on-a-Chip: Global Strategic Business Report - Research and Markets”. Elérés: 2023. május 2. [Online]. Elérhető: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5140658/lab-on-a-chip-global-strategic-business-report>
- [13] R. A. Freeze és J. A. Cherry, *Groundwater*. Englewood Cliffs, N.J: Prentice-Hall, 1979.
- [14] K. T. Trinh, „On The Critical Reynolds Number For Transition From Laminar To Turbulent Flow”. arXiv, 2010. július 14. doi: 10.48550/arXiv.1007.0810.
- [15] Anita B., Lília B., Eszter L. T., Máté V., és Péter F., „Áramlástanai jelenségek mikroszkopikus mérettartományban – mikrofluidikai rendszerek és alkalmazásaik”.
- [16] „What Are the Navier-Stokes Equations?” Elérés: 2023. július 11. [Online]. Elérhető: <https://www.comsol.com/multiphysics/navier-stokes-equations?parent=modeling-conservation-mass-energy-momentum-0402-432-302>
- [17] T. Krüger, D. Holmes, és P. Coveney, „Deformability-based red blood cell separation in deterministic lateral displacement devices-A simulation study”, *Biomicrofluidics*, köt. 8, jún. 2014, doi: 10.1063/1.4897913.
- [18] P. Sajeesh és A. K. Sen, „Particle separation and sorting in microfluidic devices: a review”, *Microfluid. Nanofluidics*, köt. 17, sz. 1, o. 1–52, júl. 2014, doi: 10.1007/s10404-013-1291-9.
- [19] „27. Earth Bacteria--E. coli”. Elérés: 2020. június 12. [Online]. Elérhető: https://www.lpi.usra.edu/publications/slidesets/marslife/slide_27.html
- [20] C. W. Shields, C. D. Reyes, és G. P. López, „Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation”, *Lab. Chip*, köt. 15, sz. 5, o. 1230–1249, márc. 2015, doi: 10.1039/c4lc01246a.
- [21] T. Zhang és mtsai., „Focusing of sub-micrometer particles in microfluidic devices”, *Lab. Chip*, köt. 20, sz. 1, o. 35–53, dec. 2019, doi: 10.1039/C9LC00785G.

- [22] R. Wang, J. Du, W. Guo, és Z. Zhu, „Investigation on the Thermophoresis-Coupled Inertial Sorting of Submicrometer Particles in a Microchannel”, *Nanoscale Microscale Thermophys. Eng.*, köt. 20, sz. 1, o. 51–65, jan. 2016, doi: 10.1080/15567265.2015.1124159.
- [23] K. Y. Castillo-Torres, E. S. McLamore, és D. P. Arnold, „A High-Throughput Microfluidic Magnetic Separation (μ FMS) Platform for Water Quality Monitoring”, *Micromachines*, köt. 11, sz. 1, Art. sz. 1, jan. 2020, doi: 10.3390/mi11010016.
- [24] Y. Zhao, B. S. Fujimoto, G. D. M. Jeffries, P. G. Schiro, és D. T. Chiu, „Optical gradient flow focusing”, *Opt. Express*, köt. 15, sz. 10, o. 6167–6176, máj. 2007, doi: 10.1364/OE.15.006167.
- [25] S. K. Jat, H. A. Gandhi, J. Bhattacharya, és M. K. Sharma, „Magnetic nanoparticles: an emerging nano-based tool to fight against viral infections”, *Mater. Adv.*, köt. 2, sz. 14, o. 4479–4496, 2021, doi: 10.1039/D1MA00240F.
- [26] L. Liu, K. Chen, N. Xiang, és Z. Ni, „Dielectrophoretic manipulation of nanomaterials: A review”, *ELECTROPHORESIS*, köt. 40, sz. 6, o. 873–889, 2019, doi: 10.1002/elps.201800342.
- [27] A. Barik és mtsai., „Graphene-edge dielectrophoretic tweezers for trapping of biomolecules”, *Nat. Commun.*, köt. 8, sz. 1, Art. sz. 1, nov. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01635-9.
- [28] X. Fu, N. Mavrogiannis, M. Ibo, F. Crivellari, és Z. R. Gagnon, „Microfluidic free-flow zone electrophoresis and isotachophoresis using carbon black nano-composite PDMS sidewall membranes”, *ELECTROPHORESIS*, köt. 38, sz. 2, o. 327–334, 2017, doi: 10.1002/elps.201600104.
- [29] M. Kim és mtsai., „A microfluidic device for label-free detection of Escherichia coli in drinking water using positive dielectrophoretic focusing, capturing, and impedance measurement”, *Biosens. Bioelectron.*, köt. 74, o. 1011–1015, 0 2015, doi: 10.1016/j.bios.2015.07.059.
- [30] D. Petrovszki és mtsai., „An integrated electro-optical biosensor system for rapid, low-cost detection of bacteria”, *Microelectron. Eng.*, köt. 239–240, o. 111523, febr. 2021, doi: 10.1016/j.mee.2021.111523.
- [31] S. Park, Y. Zhang, T.-H. Wang, és S. Yang, „Continuous dielectrophoretic bacterial separation and concentration from physiological media of high conductivity”, *Lab. Chip*, köt. 11, sz. 17, o. 2893–2900, szept. 2011, doi: 10.1039/c1lc20307j.
- [32] D. J. Cahill, C. H. Fry, és P. J. D. Foxall, „Variation in Urine Composition in the Human Urinary tract: Evidence of Urothelial Function in Situ?”, *J. Urol.*, köt. 169, sz. 3, o. 871–874, márc. 2003, doi: 10.1097/01.ju.0000052404.42651.55.
- [33] M. Antfolk, P. B. Muller, P. Augustsson, H. Bruus, és T. Laurell, „Focusing of sub-micrometer particles and bacteria enabled by two-dimensional acoustophoresis”, *Lab. Chip*, köt. 14, sz. 15, o. 2791–2799, júl. 2014, doi: 10.1039/C4LC00202D.
- [34] K. Chen, C. Sui, Y. Wu, Z. Ao, S. Guo, és F. Guo, „A digital acoustofluidic device for on-demand and oil-free droplet generation”, *Nanotechnology*, köt. 30, sz. 8, o. 084001, 0 2018, doi: 10.1088/1361-6528/aaf3fd.
- [35] Y. Chen és mtsai., „Continuous enrichment of low-abundance cell samples using standing surface acoustic waves (SSAW)”, *Lab. Chip*, köt. 14, sz. 5, o. 924–930, febr. 2014, doi: 10.1039/C3LC51001H.
- [36] W.-K. Tseng, J.-L. Lin, W.-C. Sung, S.-H. Chen, és G.-B. Lee, „Active micro-mixers using surface acoustic waves on Y-cut 128° LiNbO₃”, *J. Micromechanics Microengineering*, köt. 16, sz. 3, o. 539–548, 0 2006, doi: 10.1088/0960-1317/16/3/009.
- [37] G. Destgeer, B. H. Ha, J. H. Jung, és H. J. Sung, „Submicron separation of microspheres via travelling surface acoustic waves”, *Lab. Chip*, köt. 14, sz. 24, o. 4665–4672, 0 2014, doi: 10.1039/c4lc00868e.
- [38] R. Wang, S. Sun, W. Wang, és Z. Zhu, „Investigation on the thermophoretic sorting for submicroparticles in a sorter with expansion-contraction microchannel”, *Int. J. Heat Mass Transf.*, köt. 133, o. 912–919, ápr. 2019, doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2018.12.126.
- [39] J. R. Moffitt, Y. R. Chemla, S. B. Smith, és C. Bustamante, „Recent advances in optical tweezers”, *Annu. Rev. Biochem.*, köt. 77, o. 205–228, 2008, doi: 10.1146/annurev.biochem.77.043007.090225.
- [40] X. Wang és mtsai., „Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies”, *Lab. Chip*, köt. 11, sz. 21, o. 3656–3662, okt. 2011, doi: 10.1039/C1LC20653B.
- [41] N. Pamme, „Magnetism and microfluidics”, *Lab. Chip*, köt. 6, sz. 1, o. 24–38, 2006, doi: 10.1039/B513005K.

- [42] *Magnetic Cell Separation*. Elsevier, 2011.
- [43] J. H. Kang és mtsai., „Optimization of Pathogen Capture in Flowing Fluids with Magnetic Nanoparticles”, *Small*, köt. 11, sz. 42, o. 5657–5666, 2015, doi: 10.1002/sml.201501820.
- [44] O. Olsvik és mtsai., „Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology”, *Clin. Microbiol. Rev.*, köt. 7, sz. 1, o. 43–54, jan. 1994, doi: 10.1128/CMR.7.1.43.
- [45] B. Li és mtsai., „The development of a rapid high-quality universal nucleic acid extraction kit based on magnetic separation”, *Sci. China Chem.*, köt. 60, sz. 12, o. 1602–1608, dec. 2017, doi: 10.1007/s11426-017-9061-1.
- [46] A. H. Talasz és mtsai., „Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, köt. 106, sz. 10, o. 3970–3975, márc. 2009, doi: 10.1073/pnas.0813188106.
- [47] A. L. K. Lopes és mtsai., „Development of a magnetic separation method to capture sepsis associated bacteria in blood”, *J. Microbiol. Methods*, köt. 128, o. 96–101, szept. 2016, doi: 10.1016/j.mimet.2016.07.012.
- [48] S. H. Jung és mtsai., „Advection Flows-Enhanced Magnetic Separation for High-Throughput Bacteria Separation from Undiluted Whole Blood”, *Small*, köt. 14, sz. 34, o. 1801731, 2018, doi: 10.1002/sml.201801731.
- [49] J.-J. Lee és mtsai., „Synthetic Ligand-Coated Magnetic Nanoparticles for Microfluidic Bacterial Separation from Blood”, *Nano Lett.*, köt. 14, sz. 1, o. 1–5, jan. 2014, doi: 10.1021/nl3047305.
- [50] J. H. Kang és mtsai., „Optimization of Pathogen Capture in Flowing Fluids with Magnetic Nanoparticles”, *Small Weinh. Bergstr. Ger.*, köt. 11, sz. 42, o. 5657–5666, nov. 2015, doi: 10.1002/sml.201501820.
- [51] P. Gross, G. Farge, E. J. G. Peterman, és G. J. L. Wuite, „Combining Optical Tweezers, Single-Molecule Fluorescence Microscopy, and Microfluidics for Studies of DNA–Protein Interactions”, in *Methods in Enzymology*, köt. 475, Elsevier, 2010, o. 427–453. doi: 10.1016/S0076-6879(10)75017-5.
- [52] B. H. Wunsch és mtsai., „Nanoscale lateral displacement arrays for the separation of exosomes and colloids down to 20 nm”, *Nat. Nanotechnol.*, köt. 11, sz. 11, o. 936–940, nov. 2016, doi: 10.1038/nnano.2016.134.
- [53] T. Salafi, Y. Zhang, és Y. Zhang, „A Review on Deterministic Lateral Displacement for Particle Separation and Detection”, *Nano-Micro Lett.*, köt. 11, sz. 1, o. 77, szept. 2019, doi: 10.1007/s40820-019-0308-7.
- [54] L. R. Huang, E. C. Cox, R. H. Austin, és J. C. Sturm, „Continuous Particle Separation Through Deterministic Lateral Displacement”, *Science*, köt. 304, sz. 5673, o. 987–990, máj. 2004, doi: 10.1126/science.1094567.
- [55] T. M. Razauulla, O. M. Young, A. Alsharhan, R. D. Sochol, és R. Warren, „Deterministic Lateral Displacement Using Hexagonally Arranged, Bottom-Up-Inspired Micropost Arrays”, *Anal. Chem.*, köt. 94, sz. 4, o. 1949–1957, febr. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.1c03035.
- [56] J. McGrath, M. Jimenez, és H. Bridle, „Deterministic lateral displacement for particle separation: a review”, *Lab. Chip*, köt. 14, sz. 21, o. 4139–4158, szept. 2014, doi: 10.1039/C4LC00939H.
- [57] D. W. Inglis, J. A. Davis, R. H. Austin, és J. C. Sturm, „Critical particle size for fractionation by deterministic lateral displacement”, *Lab. Chip*, köt. 6, sz. 5, o. 655–658, máj. 2006, doi: 10.1039/B515371A.
- [58] „Microfluidic separation of blood components through deterministic lateral displacement - ProQuest”. Elérés: 2023. november 22. [Online]. Elérhető: <https://www.proquest.com/openview/04c51e28eb6bd8221484cd88f0fb886e/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750>
- [59] J. Wei és mtsai., „Numerical Study of Pillar Shapes in Deterministic Lateral Displacement Microfluidic Arrays for Spherical Particle Separation”, *IEEE Trans. NanoBioscience*, köt. 14, sz. 6, o. 660–667, szept. 2015, doi: 10.1109/TNB.2015.2431855.
- [60] Z. Zhang, E. Henry, G. Gompfer, és D. A. Fedosov, „Behavior of rigid and deformable particles in deterministic lateral displacement devices with different post shapes”, *J. Chem. Phys.*, köt. 143, sz. 24, o. 243145, dec. 2015, doi: 10.1063/1.4937171.
- [61] J. A. Davis és mtsai., „Deterministic hydrodynamics: Taking blood apart”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, köt. 103, sz. 40, o. 14779–14784, okt. 2006, doi: 10.1073/pnas.0605967103.

- [62] A. Hochstetter és mtsai., „Deterministic Lateral Displacement: Challenges and Perspectives”, *ACS Nano*, köt. 14, sz. 9, o. 10784–10795, szept. 2020, doi: 10.1021/acsnano.0c05186.
- [63] E. Pariset és mtsai., *Deterministic Lateral Displacement (DLD): Finite element modeling and experimental validation for particle trajectory and separation*. 2017.
- [64] B. M. Dincau, A. Aghilinejad, T. Hammersley, X. Chen, és J.-H. Kim, „Deterministic lateral displacement (DLD) in the high Reynolds number regime: high-throughput and dynamic separation characteristics”, *Microfluid. Nanofluidics*, köt. 22, sz. 6, o. 59, máj. 2018, doi: 10.1007/s10404-018-2078-9.
- [65] E. Pariset és mtsai., „Anticipating Cutoff Diameters in Deterministic Lateral Displacement (DLD) Microfluidic Devices for an Optimized Particle Separation”, *Small*, köt. 13, sz. 37, o. 1701901, 2017, doi: 10.1002/sml.201701901.
- [66] K. K. Zeming, S. Ranjan, és Y. Zhang, „Rotational separation of non-spherical bioparticles using I-shaped pillar arrays in a microfluidic device”, *Nat. Commun.*, köt. 4, sz. 1, Art. sz. 1, márc. 2013, doi: 10.1038/ncomms2653.
- [67] „bacteria - Diversity of structure of bacteria | Britannica”. Elérés: 2022. november 16. [Online]. Elérhető: <https://www.britannica.com/science/bacteria/Diversity-of-structure-of-bacteria>
- [68] K. Loutharback, K. S. Chou, J. Newman, J. Puchalla, R. H. Austin, és J. C. Sturm, „Improved performance of deterministic lateral displacement arrays with triangular posts”, *Microfluid. Nanofluidics*, köt. 9, sz. 6, o. 1143–1149, dec. 2010, doi: 10.1007/s10404-010-0635-y.
- [69] S. Ranjan, K. K. Zeming, R. Jureen, D. Fisher, és Y. Zhang, „DLD pillar shape design for efficient separation of spherical and non-spherical bioparticles”, *Lab Chip*, köt. 14, sz. 21, o. 4250–4262, szept. 2014, doi: 10.1039/C4LC00578C.
- [70] M. Al-Fandi, M. Al-Rousan, M. A. K. Jaradat, és L. Al-Ebbini, „New design for the separation of microorganisms using microfluidic deterministic lateral displacement”, *Robot. Comput.-Integr. Manuf.*, köt. 27, sz. 2, o. 237–244, ápr. 2011, doi: 10.1016/j.rcim.2010.06.003.
- [71] B. H. Wunsch és mtsai., „Gel-on-a-chip: continuous, velocity-dependent DNA separation using nanoscale lateral displacement”, *Lab. Chip*, köt. 19, sz. 9, o. 1567–1578, ápr. 2019, doi: 10.1039/C8LC01408F.
- [72] O. E. Ström, J. P. Beech, és J. O. Tegenfeldt, „High-Throughput Separation of Long DNA in Deterministic Lateral Displacement Arrays”, *Micromachines*, köt. 13, sz. 10, Art. sz. 10, okt. 2022, doi: 10.3390/mi13101754.
- [73] J. Marhenke, T. Dirnecker, N. Vogel, és M. Rommel, „Increasing flow rates in polydimethylsiloxane-based deterministic lateral displacement devices for sub-micrometer particle separation”, *Microfluid. Nanofluidics*, köt. 27, sz. 1, o. 2, nov. 2022, doi: 10.1007/s10404-022-02609-0.
- [74] Y. Chen és mtsai., „Concentrating Genomic Length DNA in a Microfabricated Array”, *Phys. Rev. Lett.*, köt. 114, sz. 19, o. 198303, máj. 2015, doi: 10.1103/PhysRevLett.114.198303.
- [75] V. Calero, P. Garcia-Sanchez, A. Ramos, és H. Morgan, „Combining DC and AC electric fields with deterministic lateral displacement for micro- and nano-particle separation”, *Biomicrofluidics*, köt. 13, sz. 5, o. 054110, okt. 2019, doi: 10.1063/1.5124475.
- [76] M. Jiang, A. D. Mazzeo, és G. Drazer, „Centrifuge-based deterministic lateral displacement separation”, *Microfluid. Nanofluidics*, köt. 20, sz. 1, o. 17, jan. 2016, doi: 10.1007/s10404-015-1686-x.
- [77] R. Devendra és G. Drazer, „Gravity Driven Deterministic Lateral Displacement for Particle Separation in Microfluidic Devices”, *Anal. Chem.*, köt. 84, sz. 24, o. 10621–10627, dec. 2012, doi: 10.1021/ac302074b.
- [78] H. Zhang és mtsai., „Deterministic Lateral Displacement-Based Separation of Magnetic Beads and Its Applications of Antibody Recognition”, *Sensors*, köt. 20, sz. 10, Art. sz. 10, jan. 2020, doi: 10.3390/s20102846.
- [79] Y. S. Lubbersen, M. A. I. Schutyser, és R. M. Boom, „Suspension separation with deterministic ratchets at moderate Reynolds numbers”, *Chem. Eng. Sci.*, köt. 73, o. 314–320, máj. 2012, doi: 10.1016/j.ces.2012.02.002.
- [80] K. Loutharback, J. D’Silva, L. Liu, A. Wu, R. H. Austin, és J. C. Sturm, „Deterministic separation of cancer cells from blood at 10 mL/min”, *AIP Adv.*, köt. 2, sz. 4, o. 042107, dec. 2012, doi: 10.1063/1.4758131.

- [81] R. Quek, D. V. Le, és K.-H. Chiam, „Separation of deformable particles in deterministic lateral displacement devices”, *Phys. Rev. E*, köt. 83, sz. 5, o. 056301, máj. 2011, doi: 10.1103/PhysRevE.83.056301.
- [82] R. Vernekar, T. Krüger, K. Loutharback, K. Morton, és D. W. Inglis, „Anisotropic permeability in deterministic lateral displacement arrays”, *Lab. Chip*, köt. 17, sz. 19, o. 3318–3330, szept. 2017, doi: 10.1039/C7LC00785J.
- [83] S. Ripperger és J. Altmann, „Crossflow microfiltration – state of the art”, *Sep. Purif. Technol.*, köt. 26, sz. 1, o. 19–31, jan. 2002, doi: 10.1016/S1383-5866(01)00113-7.
- [84] Y. El Rayess és mtsai., „Cross-flow microfiltration applied to oenology: A review”, *J. Membr. Sci.*, köt. 382, sz. 1, o. 1–19, okt. 2011, doi: 10.1016/j.memsci.2011.08.008.
- [85] S. Ripperger és J. Altmann, „Crossflow microfiltration – state of the art”, *Sep. Purif. Technol.*, köt. 26, sz. 1, o. 19–31, 0 2002, doi: 10.1016/S1383-5866(01)00113-7.
- [86] L. Vanyacker, P. Declerck, és I. Vankelecom, „Development of a high throughput cross-flow filtration system for detailed investigation of fouling processes”, *J. Membr. Sci.*, köt. 442, o. 168–176, szept. 2013, doi: 10.1016/j.memsci.2013.04.033.
- [87] „Microfluidic chip for blood cell separation and collection based on crossflow filtration | Request PDF”, ResearchGate. Elérés: 2020. június 17. [Online]. Elérhető: https://www.researchgate.net/publication/223530285_Microfluidic_chip_for_blood_cell_separation_and_collection_based_on_crossflow_filtration
- [88] *FERMENTÁCIÓS FELDOLGOZÁSI MŰVELETEK*. [Online]. Elérhető: http://pc.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/abet/bioelvalmuveletek/00%20Digitalis%20tananyag/Digit%E1is%20jegyzet_animaciok%20nelkul.pdf
- [89] J. Cruz, T. Graells, M. Walldén, és K. Hjort, „Inertial focusing with sub-micron resolution for separation of bacteria”, *Lab. Chip*, köt. 19, sz. 7, o. 1257–1266, márc. 2019, doi: 10.1039/C9LC00080A.
- [90] A. Bányai, E. L. Tóth, M. Varga, és P. Fürjes, „Geometry-Dependent Efficiency of Dean-Flow Affected Lateral Particle Focusing and Separation in Periodically Inhomogeneous Microfluidic Channels”, *Sensors*, köt. 22, sz. 9, Art. sz. 9, jan. 2022, doi: 10.3390/s22093474.
- [91] J. Kim, J.-R. Lee, T.-J. Je, E. Jeon, és W. Lee, „Size-Dependent Inertial Focusing Position Shift and Particle Separations in Triangular Microchannels”, *Anal. Chem.*, köt. 90, sz. 3, o. 1827–1835, febr. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b03851.
- [92] D. D. Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, és M. Toner, „Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, köt. 104, sz. 48, o. 18892–18897, nov. 2007, doi: 10.1073/pnas.0704958104.
- [93] H. W. Hou, R. P. Bhattacharyya, D. T. Hung, és J. Han, „Direct detection and drug-resistance profiling of bacteremias using inertial microfluidics”, *Lab. Chip*, köt. 15, sz. 10, o. 2297–2307, 2015, doi: 10.1039/C5LC00311C.
- [94] K. J. Smith és mtsai., „Inertial focusing of circulating tumor cells in whole blood at high flow rates using the microfluidic CTCKey™ device for CTC enrichment”, *Lab. Chip*, júl. 2021, doi: 10.1039/D1LC00546D.
- [95] N. Nivedita, P. Ligrani, és I. Papautsky, „Dean Flow Dynamics in Low-Aspect Ratio Spiral Microchannels”, *Sci. Rep.*, köt. 7, sz. 1, o. 44072, ápr. 2017, doi: 10.1038/srep44072.
- [96] G. Segré és A. Silberberg, „Radial Particle Displacements in Poiseuille Flow of Suspensions”, *Nature*, köt. 189, sz. 4760, o. 209–210, jan. 1961, doi: 10.1038/189209a0.
- [97] M. Masaeli és mtsai., „Continuous Inertial Focusing and Separation of Particles by Shape”, *Phys. Rev. X*, köt. 2, sz. 3, o. 031017, szept. 2012, doi: 10.1103/PhysRevX.2.031017.
- [98] T. Krüger, D. Holmes, és P. V. Coveney, „Deformability-based red blood cell separation in deterministic lateral displacement devices—A simulation study”, *Biomicrofluidics*, köt. 8, sz. 5, o. 054114, szept. 2014, doi: 10.1063/1.4897913.
- [99] J. Cruz és K. Hjort, „High-resolution particle separation by inertial focusing in high aspect ratio curved microfluidics”, *Sci. Rep.*, köt. 11, sz. 1, Art. sz. 1, júl. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-93177-w.
- [100] E. Keinan és mtsai., „High-Reynolds Microfluidic Sorting of Large Yeast Populations”, *Sci. Rep.*, köt. 8, sz. 1, Art. sz. 1, szept. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-31726-6.

- [101] M. A. Faridi, H. Ramachandraiah, I. Banerjee, S. Ardabili, S. Zelenin, és A. Russom, „Elasto-inertial microfluidics for bacteria separation from whole blood for sepsis diagnostics”, *J. Nanobiotechnology*, köt. 15, sz. 1, o. 3, jan. 2017, doi: 10.1186/s12951-016-0235-4.
- [102] Y.-S. Choi, K.-W. Seo, és S.-J. Lee, „Lateral and cross-lateral focusing of spherical particles in a square microchannel”, *Lab. Chip*, köt. 11, sz. 3, o. 460–465, febr. 2011, doi: 10.1039/C0LC00212G.
- [103] C. Liu, G. Hu, X. Jiang, és J. Sun, „Inertial focusing of spherical particles in rectangular microchannels over a wide range of Reynolds numbers”, *Lab. Chip*, köt. 15, sz. 4, o. 1168–1177, 2015, doi: 10.1039/C4LC01216J.
- [104] R. Moloudi, S. Oh, C. Yang, M. Ebrahimi Warkiani, és M. W. Naing, „Inertial particle focusing dynamics in a trapezoidal straight microchannel: application to particle filtration”, *Microfluid. Nanofluidics*, köt. 22, sz. 3, o. 33, márc. 2018, doi: 10.1007/s10404-018-2045-5.
- [105] J. Kim, J. Lee, C. Wu, S. Nam, D. D. Carlo, és W. Lee, „Inertial focusing in non-rectangular cross-section microchannels and manipulation of accessible focusing positions”, *Lab. Chip*, köt. 16, sz. 6, o. 992–1001, 2016, doi: 10.1039/C5LC01100K.
- [106] A. Özbey, M. Karimzadehkhoei, Ö. Bayrak, és A. Koşar, „Inertial focusing of microparticles in curvilinear microchannels with different curvature angles”, *Microfluid. Nanofluidics*, köt. 22, sz. 6, o. 62, jún. 2018, doi: 10.1007/s10404-018-2082-0.
- [107] D. Di Carlo, J. F. Edd, D. Irimia, R. G. Tompkins, és M. Toner, „Equilibrium Separation and Filtration of Particles Using Differential Inertial Focusing”, *Anal. Chem.*, köt. 80, sz. 6, o. 2204–2211, márc. 2008, doi: 10.1021/ac702283m.
- [108] Y. Zhou, Z. Ma, és Y. Ai, „Sheathless inertial cell focusing and sorting with serial reverse wavy channel structures”, *Microsyst. Nanoeng.*, köt. 4, sz. 1, Art. sz. 1, máj. 2018, doi: 10.1038/s41378-018-0005-6.
- [109] D. Yuan és mtsai., „Dean-flow-coupled elasto-inertial three-dimensional particle focusing under viscoelastic flow in a straight channel with asymmetrical expansion–contraction cavity arrays”, *Biomicrofluidics*, köt. 9, sz. 4, o. 044108, júl. 2015, doi: 10.1063/1.4927494.
- [110] J.-S. Park és H.-I. Jung, „Multiorifice Flow Fractionation: Continuous Size-Based Separation of Microspheres Using a Series of Contraction/Expansion Microchannels”, *Anal. Chem.*, köt. 81, sz. 20, o. 8280–8288, okt. 2009, doi: 10.1021/ac9005765.
- [111] L. Campo-Deaño, R. P. A. Dullens, D. G. A. L. Aarts, F. T. Pinho, és M. S. N. Oliveira, „Viscoelasticity of blood and viscoelastic blood analogues for use in polydymethylsiloxane in vitro models of the circulatory system”, *Biomicrofluidics*, köt. 7, sz. 3, o. 034102, máj. 2013, doi: 10.1063/1.4804649.
- [112] S. J. Haward, J. A. Odell, M. Berry, és T. Hall, „Extensional rheology of human saliva”, *Rheol. Acta*, köt. 50, sz. 11, o. 869–879, dec. 2011, doi: 10.1007/s00397-010-0494-1.
- [113] L. Rems, D. Kawale, L. J. Lee, és P. E. Boukany, „Flow of DNA in micro/nanofluidics: From fundamentals to applications”, *Biomicrofluidics*, köt. 10, sz. 4, o. 043403, júl. 2016, doi: 10.1063/1.4958719.
- [114] Y. Gou, Y. Jia, P. Wang, és C. Sun, „Progress of Inertial Microfluidics in Principle and Application”, *Sensors*, köt. 18, sz. 6, o. 1762, jún. 2018, doi: 10.3390/s18061762.
- [115] J. Su, X. Chen, és G. Hu, „Inertial migrations of cylindrical particles in rectangular microchannels: Variations of equilibrium positions and equivalent diameters”, *Phys. Fluids*, köt. 30, sz. 3, o. 032007, márc. 2018, doi: 10.1063/1.5018714.
- [116] T. M. Geislinger és T. Franke, „Hydrodynamic lift of vesicles and red blood cells in flow — from Fåhræus & Lindqvist to microfluidic cell sorting”, *Adv. Colloid Interface Sci.*, köt. 208, o. 161–176, jún. 2014, doi: 10.1016/j.cis.2014.03.002.
- [117] G. R. Lázaro, A. Hernández-Machado, és I. Pagonabarraga, „Rheology of red blood cells under flow in highly confined microchannels: I. effect of elasticity”, *Soft Matter*, köt. 10, sz. 37, o. 7195–7206, aug. 2014, doi: 10.1039/C4SM00894D.
- [118] L. Wang és D. S. Dandy, „High-Throughput Inertial Focusing of Micrometer- and Sub-Micrometer-Sized Particles Separation”, *Adv. Sci.*, köt. 4, sz. 10, o. 1700153, 2017, doi: 10.1002/advs.201700153.
- [119] N.-T. Nguyen, *Micromixers: Fundamentals, Design and Fabrication*. William Andrew, 2011.

- [120] A. Winzen, M. Oishi, és M. Oshima, „A numerical model-assisted experimental design study of inertia-based particle focusing in stepped microchannels”, *Microfluid. Nanofluidics*, köt. 22, sz. 3, o. 28, márc. 2018, doi: 10.1007/s10404-018-2042-8.
- [121] S. Yang, J. Young Kim, S. Jae Lee, S. Sik Lee, és J. Min Kim, „Sheathless elasto-inertial particle focusing and continuous separation in a straight rectangular microchannel”, *Lab. Chip*, köt. 11, sz. 2, o. 266–273, 2011, doi: 10.1039/C0LC00102C.
- [122] „SEM image of Escherichia coli (E.coli).” Elérés: 2022. június 1. [Online]. Elérhető: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/escherichia-coli-photos/e.coli-bacteria-sem.html>
- [123] „Scientific Image - Human Red Blood Cells (SEM) | NISE Network”. Elérés: 2022. június 1. [Online]. Elérhető: <https://www.nisenet.org/catalog/scientific-image-human-red-blood-cells-sem>
- [124] B. Alberts, *Essential cell biology*, Fourth edition. New York, NY: Garland Science, 2013.
- [125] „HeLa cell, immortal human epithelial cancer cell line, SEM”, Wellcome Collection. Elérés: 2022. június 1. [Online]. Elérhető: <https://wellcomecollection.org/works/a3q9b4tb>
- [126] F. Bai és mtsai., „Conformational Spread as a Mechanism for Cooperativity in the Bacterial Flagellar Switch”, *Science*, köt. 327, sz. 5966, o. 685–689, febr. 2010, doi: 10.1126/science.1182105.
- [127] V. Tokárová és mtsai., „Patterns of bacterial motility in microfluidics-confining environments”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, köt. 118, sz. 17, o. e2013925118, ápr. 2021, doi: 10.1073/pnas.2013925118.
- [128] K. Sinha és M. D. Graham, „Dynamics of a single red blood cell in simple shear flow”, *Phys. Rev. E*, köt. 92, sz. 4, o. 042710, okt. 2015, doi: 10.1103/PhysRevE.92.042710.
- [129] D. Bartolo, G. Degré, P. Nghe, és V. Studer, „Microfluidic stickers”, *Lab. Chip*, köt. 8, sz. 2, o. 274–279, 2008, doi: 10.1039/B712368J.
- [130] J. Zhou, D. A. Khodakov, A. V. Ellis, és N. H. Voelcker, „Surface modification for PDMS-based microfluidic devices”, *ELECTROPHORESIS*, köt. 33, sz. 1, o. 89–104, 2012, doi: 10.1002/elps.201100482.
- [131] A. Bismarck, W. Brostow, R. Chiu, H. E. Hagg Lobland, és K. K. C. Ho, „Effects of surface plasma treatment on tribology of thermoplastic polymers”, *Polym. Eng. Sci.*, köt. 48, sz. 10, o. 1971–1976, 2008, doi: 10.1002/pen.21103.
- [132] „Hydrophobic Recovery of Polydimethylsiloxane Elastomer Exposed to Partial Electrical Discharge”, *J. Colloid Interface Sci.*, köt. 226, sz. 2, o. 231–236, jún. 2000, doi: 10.1006/jcis.2000.6817.
- [133] F. Jahangiri, T. Hakala, és V. Jokinen, „Long-term hydrophilization of polydimethylsiloxane (PDMS) for capillary filling microfluidic chips”, *Microfluid. Nanofluidics*, köt. 24, sz. 1, o. 2, jan. 2020, doi: 10.1007/s10404-019-2302-2.
- [134] „Thermal aging and reduced hydrophobic recovery of polydimethylsiloxane”, *Sens. Actuators B Chem.*, köt. 114, sz. 1, o. 170–172, márc. 2006, doi: 10.1016/j.snb.2005.04.037.
- [135] M. Yao és J. Fang, „Hydrophilic PEO-PDMS for microfluidic applications”, *J. Micromechanics Microengineering*, köt. 22, sz. 2, o. 025012, 2012, doi: 10.1088/0960-1317/22/2/025012.
- [136] Z. Wu és K. Hjort, „Surface modification of PDMS by gradient-induced migration of embedded Pluronic”, *Lab. Chip*, köt. 9, sz. 11, o. 1500–1503, 2009, doi: 10.1039/B901651A.
- [137] T. Trantidou, Y. Elani, E. Parsons, és O. Ces, „Hydrophilic surface modification of PDMS for droplet microfluidics using a simple, quick, and robust method via PVA deposition”, *Microsyst. Nanoeng.*, köt. 3, sz. 1, Art. sz. 1, ápr. 2017, doi: 10.1038/micronano.2016.91.
- [138] T. Gervais, J. El-Ali, A. Günther, és K. F. Jensen, „Flow-induced deformation of shallow microfluidic channels”, *Lab. Chip*, köt. 6, sz. 4, o. 500–507, márc. 2006, doi: 10.1039/B513524A.
- [139] E. Sollier, C. Murray, P. Maoddi, és D. D. Carlo, „Rapid prototyping polymers for microfluidic devices and high pressure injections”, *Lab. Chip*, köt. 11, sz. 22, o. 3752–3765, 2011, doi: 10.1039/C1LC20514E.
- [140] S. K. Vashist, „Point-of-Care Diagnostics: Recent Advances and Trends”, *Biosensors*, köt. 7, sz. 4, Art. sz. 4, dec. 2017, doi: 10.3390/bios7040062.
- [141] A. Olanrewaju, M. Beaugrand, M. Yafia, és D. Juncker, „Capillary microfluidics in microchannels: from microfluidic networks to capillary circuits”, *Lab. Chip*, köt. 18, sz. 16, o. 2323–2347, 2018, doi: 10.1039/C8LC00458G.

- [142] B. Liu, D. Koh, A. Wang, P. Schneider, és K. W. Oh, „Hermetic encapsulation of negative-pressure-driven PDMS microfluidic devices using paraffin wax and glass”, *Microsyst. Technol.*, köt. 24, sz. 4, o. 2035–2043, ápr. 2018, doi: 10.1007/s00542-017-3600-9.
- [143] Y. Lee, I. Seder, és S.-J. Kim, „Influence of surface tension-driven network parameters on backflow strength”, *RSC Adv.*, köt. 9, sz. 18, o. 10345–10351, 2019, doi: 10.1039/C8RA09756A.
- [144] M. T. Guler, Z. Isiksacan, M. Serhatlioglu, és C. Elbuken, „Self-powered disposable prothrombin time measurement device with an integrated effervescent pump”, *Sens. Actuators B Chem.*, köt. 273, o. 350–357, nov. 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.06.042.
- [145] G. Katsikis, A. Breant, A. Rinberg, és M. Prakash, „Synchronous magnetic control of water droplets in bulk ferrofluid”, *Soft Matter*, köt. 14, sz. 5, o. 681–692, 2018, doi: 10.1039/C7SM01973D.
- [146] L. Xu, A. Wang, X. Li, és K. W. Oh, „Passive micropumping in microfluidics for point-of-care testing”, *Biomicrofluidics*, köt. 14, sz. 3, o. 031503, máj. 2020, doi: 10.1063/5.0002169.
- [147] G. C. Lisensky és *mtsai.*, „Replication and Compression of Surface Structures with Polydimethylsiloxane Elastomer”, ACS Publications. Elérés: 2023. június 6. [Online]. Elérhető: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed076p537>
- [148] M. Liu, J. Sun, és Q. Chen, „Influences of heating temperature on mechanical properties of polydimethylsiloxane”, *Sens. Actuators Phys.*, köt. 151, sz. 1, o. 42–45, ápr. 2009, doi: 10.1016/j.sna.2009.02.016.
- [149] M. L. Fitzgerald, S. Tsai, L. M. Bellan, R. Sappington, Y. Xu, és D. Li, „The relationship between the Young’s modulus and dry etching rate of polydimethylsiloxane (PDMS)”, *Biomed. Microdevices*, köt. 21, sz. 1, o. 26, márc. 2019, doi: 10.1007/s10544-019-0379-8.
- [150] H. T. Kim és O. C. Jeong, „PDMS surface modification using atmospheric pressure plasma”, *Microelectron. Eng.*, köt. 88, sz. 8, o. 2281–2285, aug. 2011, doi: 10.1016/j.mee.2011.02.084.
- [151] S. Bhattacharya, A. Datta, J. M. Berg, és S. Gangopadhyay, „Studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength”, *J. Microelectromechanical Syst.*, köt. 14, sz. 3, o. 590–597, jún. 2005, doi: 10.1109/JMEMS.2005.844746.
- [152] „Spectrum [Fluorescein] | AAT Bioquest”. Elérés: 2023. október 6. [Online]. Elérhető: <https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/fluorescein>
- [153] „Analyze Menu”. Elérés: 2023. június 1. [Online]. Elérhető: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html#plot>
- [154] „DHC-N01 (Neubauer Improved)”. Elérés: 2023. augusztus 9. [Online]. Elérhető: <https://www.countcell.com/dhcn01.htm>
- [155] C. Kleinstreuer, *Modern Fluid Dynamics: Basic Theory and Selected Applications in Macro- and Micro-Fluidics*, köt. 87. in *Fluid Mechanics and Its Applications*, vol. 87. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. doi: 10.1007/978-1-4020-8670-0.
- [156] „Meshing Your Geometry: When to Use the Various Element Types”, COMSOL. Elérés: 2023. július 11. [Online]. Elérhető: <https://www.comsol.com/blogs/meshing-your-geometry-various-element-types/>
- [157] „Finite Element Mesh Refinement Definition and Techniques”. Elérés: 2023. július 11. [Online]. Elérhető: <https://www.comsol.com/multiphysics/mesh-refinement>
- [158] „FLUORESCENT PARTICLES (5 Micron and Larger) - Spherotech”. Elérés: 2024. április 5. [Online]. Elérhető: https://www.spherotech.com/five_up.htm
- [159] C. L. Woldringh, J. S. Binnerts, és A. Mans, „Variation in Escherichia coli buoyant density measured in Percoll gradients.”, *J. Bacteriol.*, köt. 148, sz. 1, o. 58–63, okt. 1981.
- [160] N. Norouzi, H. C. Bhakta, és W. H. Grover, „Sorting cells by their density”, *PLoS ONE*, köt. 12, sz. 7, o. e0180520, júl. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0180520.
- [161] „Cell density - Budding yeast *Saccharomyces ce* - BNID 103876”. Elérés: 2024. április 5. [Online]. Elérhető: <https://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?&id=103876&ver=2>
- [162] Krisztina S., „TEJSAVBAKTÉRIUMOK ÉS ÉLELMISZER-EREDETŐ ROMLÁS- ÉS KÓROKOZÓ BAKTÉRIUMOK VERSENGI KÖLCÖNHATÁSÁNAK VIZSGÁLATA”.

- [163] A. Karimi, D. Karig, A. Kumar, és A. M. Ardekani, „Interplay of physical mechanisms and biofilm processes: review of microfluidic methods”, *Lab. Chip*, köt. 15, sz. 1, o. 23–42, 2015, doi: 10.1039/C4LC01095G.
- [164] „bacteria - Capsules and slime layers | Britannica”. Elérés: 2022. november 16. [Online]. Elérhető: <https://www.britannica.com/science/bacteria/Diversity-of-structure-of-bacteria>
- [165] M. Kinnunen, A. Kauppila, A. Karmenyan, és R. Myllylä, „Effect of the size and shape of a red blood cell on elastic light scattering properties at the single-cell level”, *Biomed. Opt. Express*, köt. 2, sz. 7, o. 1803–1814, jún. 2011, doi: 10.1364/BOE.2.001803.
- [166] „Red Blood Cell (RBC) Size Variation - LabCE.com, Laboratory Continuing Education”. Elérés: 2022. november 16. [Online]. Elérhető: https://www.labce.com/spg579126_red_blood_cell_rbc_size_variation.aspx
- [167] H. Feldmann, *Yeast: Molecular and Cell Biology*. John Wiley & Sons, 2011.
- [168] A. Ozbey és mtsai., „Inertial focusing of cancer cell lines in curvilinear microchannels”, *Micro Nano Eng.*, köt. 2, o. 53–63, márc. 2019, doi: 10.1016/j.mne.2019.01.002.
- [169] „Mágnes - Technikai információk - NeoMagnet”. Elérés: 2023. november 28. [Online]. Elérhető: <https://neomagnet.hu/neodimium-technikai-informacio>
- [170] A. T. Alsharhan, A. J. Stair, R. Acevedo, T. Razauulla, R. Warren, és R. D. Sochol, „Direct Laser Writing for Deterministic Lateral Displacement of Submicron Particles”, *J. Microelectromechanical Syst.*, köt. 29, sz. 5, o. 906–911, 2020, doi: 10.1109/JMEMS.2020.2998958.
- [171] N. Tottori és T. Nisisako, „Particle/cell separation using sheath-free deterministic lateral displacement arrays with inertially focused single straight input”, *Lab. Chip*, köt. 20, sz. 11, o. 1999–2008, 2020, doi: 10.1039/D0LC00354A.
- [172] S. H. Holm, J. P. Beech, M. P. Barrett, és J. O. Tegenfeldt, „Separation of parasites from human blood using deterministic lateral displacement”, *Lab. Chip*, köt. 11, sz. 7, o. 1326–1332, 2011, doi: 10.1039/C0LC00560F.
- [173] D. Holmes és mtsai., „Separation of blood cells with differing deformability using deterministic lateral displacement”, *Interface Focus*, köt. 4, sz. 6, o. 20140011, dec. 2014, doi: 10.1098/rsfs.2014.0011.
- [174] D. W. Inglis, N. Herman, és G. Vesey, „Highly accurate deterministic lateral displacement device and its application to purification of fungal spores”, *Biomicrofluidics*, köt. 4, sz. 2, o. 024109, máj. 2010, doi: 10.1063/1.3430553.
- [175] A. Sherbaz, B. M. K. Konak, P. Pezeshkpour, B. Di Ventura, és B. E. Rapp, „Deterministic Lateral Displacement Microfluidic Chip for Minicell Purification”, *Micromachines*, köt. 13, sz. 3, Art. sz. 3, márc. 2022, doi: 10.3390/mi13030365.
- [176] N. Xiang, Q. Li, és Z. Ni, „Combining Inertial Microfluidics with Cross-Flow Filtration for High-Fold and High-Throughput Passive Volume Reduction”, *Anal. Chem.*, köt. 92, sz. 9, o. 6770–6776, máj. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c01006.
- [177] L. E. Head és M. R. Bird, „The Removal of Psychrotropic Spores from Milk Protein Isolate Feeds Using Tubular Ceramic Microfilters”, *J. Food Process Eng.*, köt. 36, sz. 1, o. 113–124, 2013, doi: 10.1111/j.1745-4530.2011.00661.x.
- [178] A. Putra, I. Alif, A. Prasetyo, és S. Prawitasari, „Comparison of Two Tangential Flow Filtration Methods in Isolating CD63+/CD9+ Mesenchymal Stem Cell Exosome”, *Int. J. Cell Biomed. Sci.*, köt. 2, sz. 4, o. 147–152, 2023.
- [179] H.-W. Liu és mtsai., „Scalable Purification of Plasmid DNA Nanoparticles by Tangential Flow Filtration for Systemic Delivery”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, köt. 13, sz. 26, o. 30326–30336, júl. 2021, doi: 10.1021/acsami.1c05750.
- [180] Y. Wang, K. Keller, és X. Cheng, „Tangential Flow Microfiltration for Viral Separation and Concentration”, *Micromachines*, köt. 10, sz. 5, Art. sz. 5, máj. 2019, doi: 10.3390/mi10050320.
- [181] J. Oakey, R. W. Applegate, E. Arellano, D. D. Carlo, S. W. Graves, és M. Toner, „Particle Focusing in Staged Inertial Microfluidic Devices for Flow Cytometry”, *Anal. Chem.*, köt. 82, sz. 9, o. 3862–3867, máj. 2010, doi: 10.1021/ac100387b.
- [182] A. E. Reece, K. Kastrup, H. D. Sikes, és J. Oakey, „Staged inertial microfluidic focusing for complex fluid enrichment”, *RSC Adv.*, köt. 5, sz. 66, o. 53857–53864, jún. 2015, doi: 10.1039/C5RA10634F.

- [183] W. Lee és *mtsai.*, „3D-Printed Microfluidic Device for the Detection of Pathogenic Bacteria Using Size-based Separation in Helical Channel with Trapezoid Cross-Section”, *Sci. Rep.*, köt. 5, sz. 1, Art. sz. 1, jan. 2015, doi: 10.1038/srep07717.
- [184] P. Chen, Y.-Y. Huang, K. Hoshino, és J. X. J. Zhang, „Microscale Magnetic Field Modulation for Enhanced Capture and Distribution of Rare Circulating Tumor Cells”, *Sci. Rep.*, köt. 5, sz. 1, Art. sz. 1, márc. 2015, doi: 10.1038/srep08745.
- [185] B. Friedrich és *mtsai.*, „Magnetic Removal of *Candida albicans* Using Salivary Peptide-Functionalized SPIONs”, *Int. J. Nanomedicine*, köt. 18, o. 3231–3246, dec. 2023, doi: 10.2147/IJN.S409559.
- [186] I. Pereiro és *mtsai.*, „Magnetic fluidized bed for solid phase extraction in microfluidic systems”, *Lab. Chip*, köt. 17, sz. 9, o. 1603–1615, 2017, doi: 10.1039/C7LC00063D.
- [187] H. Lee, J. Jung, S.-I. Han, és K.-H. Han, „High-speed RNA microextraction technology using magnetic oligo-dT beads and lateral magnetophoresis”, *Lab. Chip*, köt. 10, sz. 20, o. 2764–2770, 2010, doi: 10.1039/C005145D.

12. Függelék

Célminta	Médium	Méret (Ø)	Célminta koncent-ráció	Áramlási sebesség	Szeparálási hatások	Módszer	Geometria			Ref.
							Dc	G	θ	
gyöngy (porisztírol vagy karboxilát)	KCl dH2O-ban 12,5 mS/m	karboxilát gyöngy; 1 µm 100, 500 nm	n.m	50 µm/s	-0,25 V DC; 500 Hz (320 Vpp) célminták szeparálása	AC, DC elektromos mező segített DLD, kör alakú oszlop [M 8 µm]; elentróda planáris, egymástól [D 2,2 mm]; [L 31,3 mm]	6.3 µm	18 µm	3,18°	[75]
	DI víz + Tween 20	860 nm	n.m	n.m	célminta térítés 15,3±8,6 µm	gyémánt alakú oszlop; csatorna [L 500 µm] [H 22µm]; [W 180 µm]; oszlop [3,5x3,5 µm]	831 nm	2,5 µm	0,05 rad	[170]
CTC (keringő tumorsejt) MCF-7	hígított vér (10x - en PBS-ben)	14 ± 2 µm	10 ⁴ sejt/ml	5 ml/h	99%	³ két lépcsős DLD, kör oszlop MCF-7 véralkotóktól szeparálás	8-10 µm	20 µm	n.m	[171]
parazita (Afrikai tripanoszóma - fonálszerű)	teljes vér (+ véralvadásagátló)	[L~30 µm] [W~ 2,5 µm]	Vörösvértest = 4.9 × 10 ⁶ /µl, Fehér véresejt = 2600 /µl , trypanosomes = 8400 /µl	1 µl/s	parazita dúsítása a szűrletben 100x; vörös véretek 99%-ban elkülönítettek; fehér véresejt elkülönítve és 200x dúsítva	kör alakú oszloprendszer, 13 szekcióból áll, mindegyike egyedi Dc-vel; véralkotóktól T. cyclops parazita szeparálás, csatorna [H 4 vagy 11 µm]	Dc/µm = 3-9	12 µm	növekvő	[172]
véralkotók (T-leukocita és – fehérvérsejt; vörösvértest)	hígított vérből (vér: PBS; 1:20)	vörösvértest [M 1-2.5 µm; SZ 6- 8 µm] fehérvértest [8- 10 µm]	1 x 10 ⁵ sejt/ml	1 mm/s; majd növekvő (20 mbar- 600 mbar nyomás)	0.01% glutáraldehiddel kezelt rigidebb vörösvértest 1200µm-nal jobb térülés 1100 mbar nyomás mellett, mint a kezeletlen; leukocita szubpopuláció is szeparálható	rigiditás szerinti vizsgálta; glutáraldehiddel (0-0.01%) kezelt vörösvértestek; kör alakú oszlopok, 14 szelcióval, szakaszonként elérő Dc értékkel, csatorna [H 25 µm]	3 – 9 µm; + 0,5 µm/sze kcio	12 µm	növekvő	[173]
spóra (Apergillus)	PBS 0.1% Tween	4.4 ± 0.9 µm	4.4x10 ⁶ spóra/ml	5,5 µl/min	96% (4x futtatás, kicsi (0.1-3.5 µm) nagy (5-10 µm) populáció elkülönítés; 400 spóra/s	szegregálás 2 részletben, kör oszlopok	¹ 3.5; ² 5µm	10.5 µm	¹ 2.86° ² 5.7°	[174]
baktérium E. coli	Luria-Bertani (LB) médium	¹ kis sejtek: 400-500 nm; ² E. coli: 1-10 µm	240000 db/ml	10,25,50 µl/ min	75,5% szeparáció	kör alakú oszlop (25 µm), gömb alakú minisejtektől és szülő sejtektől (Ø=400-500 nm) pálcika alakú baktérium szeparálás	500 nm	2.5 µm	1°	[175]
baktérium ¹ E. coli ² K. Pneumonia ³ P. aeruginosa ⁴ S. Epidermidis	dH2O	¹ [SZ 0,5µm; L 2 µm] ² [SZ 0,6 µm; L 1,8 µm] ³ [0,6 µm; 1,6 µm] ⁴ [0,7 µm]	n.m	n.m	100% eltérítés I alakú oszloppal	oszlopalak: négyzet, I, L, T, üllő, valamint fordított L,T, üllő csatorna hossz 14 mm, szélesség 700 µm; oszlop méret 6 µm, 3 µm gyöngy, vörösvértest és baktériumok szeparálása, oszlopok rangsorolása szeparációs index alapján (legjobb szeparálás I oszlop, legrosszabb, kör alakú oszlop)	1 µm	4µm	1,6°	[69]
extracelluláris vezikula	vizelet	20-110 nm	0,01-0,02% gyöngy -térfogat frakció	200-300 µl/s	kisebb vezikulák dúsítása, 60-70 nm részecskék térítése, 100 nm- nél nagyobb exoszómák elkülönítése	kő alakú oszlopok alkalmazása,	0,37xG	25-235 nm	5.7°	[52]
DNS	0-5-10%(w/v) PEG	10-1000 nm	166 kbp T4 DNS	20-40 µm/s	DNS tartalom 87x koncentráció	kör oszlop DLD; elektroforézis segített; [H 10 µm]; [L 3 cm]	0.7-1.1 µm	1.4-3 µm	3.8°	[74]

11. táblázat Determinisztikus oldal irányú térítés módszere változatos célmintára célzottan. Jelölés: hossz[L]; magasság[H]; szélesség[W]; távolság [D]; nem említett (n.m.)

Célminta	Médium	Méret (Ø)	Célminta koncentráció	Áramlási sebesség	Szeparálási hatások	Módszer	Geometria	Ref.
CTC (keringő daganatsejt)	PBS	¹ Fehér véresejt(fvs.: ~ 10 µm; ² MCF-7: ~20 µm)	10 ⁶ db/ml (MCF-7 különböző arányban adagolva: 0.09% és 0.99%)	4ml (3-6ml)	koncentrálási nagyságrend: ¹ 11.3; ² 10.79 recovery efficiency: ¹ 90.4%; ² 87.97% 1100x dúsítás	inerciális microfluidika kombinálása keresztirányú filtrálással	spirális keresztáramlásos szűrő [H ¹ 100,150 µm]	[176]
Véralkotók	hígított vér (100x)	vv.[2 µm; 8 µm]; fvs.[> 10 µm; limfociták 6-15 µm]	10 ⁴ sejt/µl	10 µl/min	oszlopos szűrés: vvt. > 85,3%-ban eltávolítva; gátas szűrés: vvt. > 93,3%-ban eltávolítva	HxWxL[30 µm x 60 µm x 160 mm]; oszlopok [Ø20 µm, rész 6,5 µm]; gát[rész H 3,5 µm];	¹ oszlopos vs. gátas elrendezés; ² 2 sor oszlop (Øoszl.= 20 µm); 6,5 µm rész; gát[H 26,5 µm, W 20 µm]	[87]
spóra (Bacillus mycoides spóra)	tej (Ultranor 9075 Tejfehérje Izolátum por[MPI]: 5,10,15 tömeg%)	hossza[1,53 ± 0,18]; szélessége[0,9 ± 0,11]	10 ⁴ és 10 ⁵ cfu/ml baci	0,7 - 2 m/s	pórus 12 µm, [MPI]:10tömeg% 123 L/m ² /h flux; fehérje átvitel 90%; logaritmus 2,6 rendű csökkenés a sőrészében	5féle Membralox α-alumínium-oxid kerámia membrán tesztelése; pórusméret: 0,7;1,4;2;5;12 µm;	memránhossz: 1,02 mm; 19 csatorna, ennek Ø-je 4 mm; szűrés felülete: 0,244 m ² / membrán	[177]
baktérium Pseudomonas aeruginosa	víz	pálcika alakú: Ø=[0.5-0.8 µm; 1.5-3.0 µm]	1x10 ⁸ sejt/ml	p=100mbar vcf= 1cm/s	~60.5-82.3%	2x14x0.1cm ³ térfogat membránra pumpálva; poliamid membrán	6 CF egység; poliamid felső a bemenettel;	[86]
extracelluláris vezikula (EV),(CD63+/CD9+)	MSC- kondicionált médium	60-150 kDa	n.m	n.m	CD63+/CD9+ EV jelenléte ¹ 500-1000 kDA; ~10% jelenlét ² 100-300 kDA; ~ 11%	tangenciális áramlásos szűrés (TFF) 2féle szűrő sorrend: ¹ 1000-5-500-300-100-50-10-5 ² 1000-500-300-100-50-10-5	keresztáramlásos szűrő, nem részletezett	[178]
DNS (plazmid DNS)	részben PBS	68 nm	pDMS/IPEI nanorészecske 40 µg/ml (citotoxicitás mérésnél pDNS konc. 0.05-1 µg 1x10 ⁴ sejtre, ebben szabad IPEI médiumban 0-0.5mM)	15.5 ml/min	24%-ra csökkentett szabad IPEI tartalom, és a nanorészecskek 80%os visszatartása	nanorészecskek lineáris polietilén-imin (IPEI) és pDNS szűrése citotocitás mérése, szabad IPEI jelenlétének vizsgálata transzfekció hatékonyságára vizsgáltan	módosított polieterszulfon (mPES/300 kDA) szűrő	[179]
vírus (HIV)	PBS	100 nm	¹ 5x10 ⁶ ; ² 1x10 ⁷ részecske/ml (4féle koncentrációból a legjobb eredmények)	1700-2400 µl/h	¹ 49.49±9.68% ² 53.54±3.77% minta jut át a szűrőn; ¹ 45.21±4.18% ² 48.54±18.70% vírus elkapás közel 100%-os az átjutott minta mennyiséghez normalizálva	50 nm pórusmérettel polikarbonát (PC) membránon keresztüli szűrt	2 PDMS csatorna (H=0.1 mm, L=30mm és ellenállási csatorna H=0.04mm és L=65mm) között polikarbonát szűrő 50nm-es résmérettel, 10µm magas	[180]

12. táblázat Crossflow térítés módszere változatos célmintára célzottan. Jelölés: hossz[L]; magasság[H]; szélesség[W]; távolság [D]; nem említett (n.m.)

Célminta	Médium	Méret (Ø)	Célminta koncentráció	Áramlási sebesség	Szeeparálási hatásfok	Módszer	Geometria	Ref.
gyöngy (polisztirol)	dH2O	10, 15, 20, 45 µm	10 ³ -10 ⁴ gyöngy/ml	20<Rec<800 0.05-5 ml/min	99% (Re<100)	egyene, trapéz keresztmetszet	[L 40 mm]; [H 50 µm] oldalarány ~4, Tan (a) ~0.45	[104]
	DI víz	10, 15, 20 µm	0.01 wt%	400-2700 µl/min	-	gömbületes csatoma eltérő görbülettel (280°, 230°, 180°)	[H 90-75-60µm]	[106]
	víz	9.9µm	0.05%	(Rep=2.9 ->3.9->2.8)	99%	két lépéses téglalast, háromszög, félkör	[L 2.5 + 1+ 1 cm]	[105]
	vizes oldat (0.5 wt% Tween 20)	¹ 2, ² 7, ³ 15 µm	¹ 98.2, ² 26.5, ³ 5.4 gyöngy x10 ³ /µl	10-190 µl/min (Rec= 7-133)	áteresztőképesség=1-5x10 ⁴ részecske/s Max. (Recovery, Tisztaság;Re.) ¹ 90%;-;(1)14 és 220,(2)112 ² 93,7%;26,6%;70; ³ 75,2%;36,4%;98	többnyílású áramlás frakcionálás (MOFF)	[H 50-55 µm] [L 36 mm] összehúzóadások=120 db egyenes csatoma [W 45-50 µm] négyzetes kiszélesedésekkel [W200x200 µm] egymástól 100 µm-ra, majd 0.8 mm-re kiszélesedő csatoma	[110]
	Newtoni vs nem-Newtoni folyadék (DI víz, PEO)	3.2, 4.8, 13µm	10 ⁷ gyöngy/ml	10-300 µl/min	- nagy áteresztőképesség (>10000/s)	egyenes csatoma, táromszög alakú kiszélesedéssel (Sz=100 µm, H= 50 µm)	tágulási-összehúzóadási - üregtömbök	[109]
	n.m	10.2 µm	0.1 w/v% (2x10 ⁶ részecske/ml)	20-100 µl/min (Re _p <6)	- áteresztőképesség: akár 50000 részecske/s	3 részes kombinált csatoma; aszimmetrikus szerpentin és egyenes szakaszok kombinálása, pontos poicionálás áramlásos citometriához	[H 50 µm];[SZ 100-ról 30 µm-ra szűkül]	[181]
CTC (¹ A431; ² MCF-7)	¹ PBS	>9.9 µm	2x10 ⁶ sejt/ml	u=0.5 m/s Re _p =1.5	átfutás 1- 4.; koncentráció növekedés 2, 4,10,15 x	kombinált: 1. széles egyeneses, 2. aszimmetrikus hullám, 3. magas egyenes	[H;Wµm] 1. (35; 80) 2. (35;120) 3. (35;20)	[182]
	² hígított vér	3 -15µm	~5x10 ⁷ sejt/ml	49,41 µl/min-197,6 µl/min	89,72% recovery, dúsítás 5.3%-ról 68.9%	segédáramlás	fordított hullámcsatoma H=40 µm; Sz=125 µm; felső-külső/, belső félkör= 800, 350 µm; alsó külső kör: 3 féle 800, 1000, 1200 µm	[108]
gyöngy A431 sejt	PBS	9.9 µm	2x10 ⁶ gyöngy/ml	0.5 m/s (Rep=1.5)	4szeres futtatásra 15x dúsítás	csatomamagasságok tesztelése	3 szakasz: ¹ egyenes; széles, ² hullámcsatoma; ³ egyenes; magas, [H 35 µm]; [SZ ¹ 80; ² 120; ³ 30 µm]	[182]
MCF-7 (gyöngy 15;10;8)	hígított vér (500x)	MCF-7 méretbeli eltérés: 13-24 µm	VVt : MCF-7 10000:1	Re=20;60	áteresztőképesség 1.1x10 ⁶ sejt/perc; 95.2±4.8% hatékonyság; <2 µm felbontás; vérsajt kilökődés arány: 94.8±0.6%	eltérő csatomaalak kombinálása	3 részes[W;H;L]: ¹ téglalast[21 µm;40µm;2cm] ² egylenő szárú derékszögű háromszög [76µm;43µm;2cm]	[91]
Véralkotók (¹ vvv; ² vérlemezek)	¹ PBS	gyöngy: 2,3,9,10,17 µm; vvt. 2-8 µm	1. 1% gyöngyoldat 2. 2% v/v hig.	Rc= 0.075-225 Rp= ~ 0.15 – 0.24 (10 µm); 2. u=0.5 m/s	v=1.5 ml/min 1% gyöngyoldat Rc ~ 90 1g/hr	aszimmetrikus hullámcsatoma	L=3cm Dh=10–87µm	[92]
	² 2% vér PBS-ben (10 ml)	2-4 µm (7-15 µm)	1µl vérben: ~5 × 10 ⁶ RBCs, (2-5) × 10 ⁵ lemezek, and (5- 10) × 10 ³ WBCs	0.9ml/min (Rep=1.53) Rc=115	5 kimenet: 5. kim: nincs célminta, 2x dúsítása a nagy sejteknek; 3. kim.: lemezekék 100x dúsítása	asszimmetrikus kanyarulos csatoma	kanyarulat 350 és 650 µm H= 50 µm	[107]
gyöngy, RBC	hígított vér, 1µM fluoreszcein oldat	10 µm	n.m	3 ml/min De=17;37 g1:28.2-30.6; Re= 200 g2: 35-36.5; Re= 200-260 g3:De 38	n.m	geometria függő célminta pozícionálási kísérlet; numerikus szimuláció	spirál; 3 féle oldalarány AR = 0.6;0.4;0.2 g1(250 µm × 150 µm), g2(250 µm × 100 µm) g3(500 µm × 100 µm)	[95]

gyöngy és VVt	2-17 μm	hígított vér (2v/v%)	2v/v%; vér PBS-ben 0.5-5%-ban hígítva	0.5 m/s; Rc= 0.075-225	99% vs. 99.8% jet életképesség volt mérve	asszimmetrikus hullámcsatorna, változatos részecskeméret, Rc és De értékek használatával	Dh: 10–87 μm	[92]
baktérium (E. coli)	hígítatlan vér	1-3 μm gyöngy: 5 és 2 μm	10 ⁶ CFU/ml	minta=30 $\mu\text{l/h}$ PEO = 360 $\mu\text{l/h}$ Re 0.25-2.1 (Rp 0.002-0.015 (for 5 μm))	5 μm - 95% 2 μm - 93%; fehér vérsejtek – 92% E. coli 76%	nem-Newtoni folyadék fókuszálása	[L=35 mm]; [H 55 μm]; [W 65 μm]	[101]
	tej	mágneses nanorészecske kluszter ¹ szabadon Ø= 150nm ² E. coli-t kötve	10cfu/ml-100cfu/ml (10 ml minta)	PBS= 5 ml/min minta= 5 ml/min	100cfu/ml - tejben (10 ml minta)	trapéz csatornakeresztmetszet, spirális csatorna 10 hurokkal	W _{trapéz} = 1000 μm ; H _{trapéz} =250 és 500 μm hurok _r =1.5 cm	[183]
¹ gyöngy ² cianobaktérium(Synechocystis sp. PCC 6803))	DI víz	¹ 2 μm ; 920, 200 nm; ² 2 μm gy. + 2 μm cianob.	0.01-1v/v% ¹ (10 ⁷ /ml-10 ⁹ /ml) ² 0.01 és 0.01 v/v% (10 ⁷ /ml gy. és 2.5x10 ⁷ /ml c.)	¹ 100-1400 $\mu\text{l/min}$ (Re=11.1-1550) ² 300 $\mu\text{l/min}$	97% dúsítás	aszimmetrikus szerpentin csatorna	4 mm hosszú; 100 elem, szerpentin csatorna;SZ: kis kanyar 20 μm ; nagy k. 80 μm ; végén 150 μm kiszélesedéssel; M= 10 μm	[118]
bekátium E. coli, P. aeruginosa, Saureus, E.faecallis	3x hígított teljes vér valamint teljes vér (köpeny folyam PBS)	Vvt. (~ 6-8 μm) E. coli (<1 μm)	E. coli: 10-10 ⁴ /ml	1700 $\mu\text{l/min}$ (szeptraálás 20 perc/ml-teljes vér-10-100 /ml)	> 65 °baktérium recovery 10-50/ml	baktérium szeparálás (20perc/ml); majd RNS detekció és antibiotikum fogékonyság teszt (8 óra)	spirál, M.80 μm ; SZ: 500 μm ;L: 10 cmSZ: 75 μm SZi:425 μm Szo:200 μm	[93]
baktériumok (¹E. coli, ²Salmonella typhimurium; ³Klebsiella pneumoniae)	DI víz	⁰ gyöngy (¹ 1, ² 2 μm) [W;L]: ¹ ~ 0.5; ~ 1 μm , ² ~ 0.4; ~ 1.15 μm ; ³ ~ 0.6; ~ 0.9 μm	10 ⁻⁶⁻⁸ részecske/ml)	30-180 $\mu\text{l/min}$ (Re=22-133)	⁰ recovery (^a 96,8%; ^b 98,1%) ¹ E. coli 6.5x koncentrálás; recovery 99.3%; 120 $\mu\text{l/min}$ esetén)	két kanyarú csatorna, COMSOL szimuláció	(R=0.5 mm); M=10 μm , majd 7.3 μm ; SZ=20 μm	[89]

13. táblázat Laterális fókuszálás módszere változatos célmintára célzottan. Jelölés: hossz[L]; magasság[H]; szélesség[W]; távolság [D]; nem említett (n.m.)

Célminta	Médium	Méret (Ø)	Célminta koncentráció	Aramlási sebesség	Szeparálási hatékonyság	Módszer	Geometria	Mágneses erő	Ref.
CTC (COLO205 sejtek)	teljes vér	~ 20 µm CTC; gyöngy ~ 100 nm	150 sejt/10-20 µl, 2,5 ml vérben	2,5 ml/h	~ 19%-ban javította sejtesapdázást; 14%-ban javította az eloszlás uniformitását	vékony filmt mikromágnes mintázat, nikkeltől [W 20 µm x H 200 nm], egymástól [D 100 µm]	csatoma magasság 500 µm; hossza 30 mm; permanens mágnes a fluidika felett	0,3 T ² /m	[184]
Candida albicans gomba	vér	peptid funkcionizált superparamágneses vas-oxid nanorészecske (SPION); 1,8 µm ± 120 nm	100 és 300 µg Fe/ml; gomba 10 ³ CFU/ml	10 ml/mint	víz alapú méfumból > 80%; vérből ~ 55% eltávolítása	3-amino-propil-trietoxi-szilán (APTES) kezelt és GP340 fehérje ével funkcionizált gyöngyökkel gomba csapdázás	n.m, szimulációk alapján: kör kamrában, [H ~ 10 mm]; [Ø ~18mm]	275 mT	[185]
baktériumok (E. coli)	Teljes vér	mágneses gyöngy Ø=1 µm	10 ⁴ CFU/ml	0,6 ml/h (1,67 µl/s) (Re 50)	91,68%± 2,18%	ferromágneses nikkeltől	mágnes 100 µm vastag; 45° ferde homyok, spirális áramlás [H100 és 50 µm]; [W1000µm] nikkeltől mikrostruktúra 0.5cmx2.4cmx100µm	7,68 µN	[48]
	Víz	avidin kötött, mágneses lemez Ø=1.5 µm; 80 nm vastag	6,5 µg/ml és 0,065 µg/ml lemez; E. coli 100 CFU/ml szűrés 50-100 ml (< 15 perc)	120 µl/s	90%	Ø1.5 µm , 80 nm vastag, mágneses lemez	NdFeB mágnes, 3x3 tömb változó polaritással elhelyezve (6,35x6,35x6,35 mm ³ kockák); csatoma:[H 60 µm]; [L 45 mm]; 4 párhuzamos csatoma	0-8 x 10 ⁻¹¹ N	[23]
	szarvasmarha vér (hígított)	mágneses nanorészecske Ø=100 nm	E. coli 5x10 ⁶ CFU/ml vvt. 10 ⁸ /ml (2 ml) MNP 10 ¹¹ /ml	(2 ml/ kör szűrés) 60ml/h 16,67 µl/s	4 szűrésnél 88%	Fe ₃ O ₄ gyöngy, PEG-DPA-Zn funkcionizált E. coli kötés idő < 1 min	egyenes csatoma , 2-2 be és kimenet, 3 korongmágnes oldalán	n.m	[49]
Fluoreszcens marker model (Rabbit anti-Mouse IgG Alexa – és CD1A Human IgG1 Alexa Fluor® 488)	PBS	mágneses gyöngy Ø=1-5 µm	0.2 ng/ml (200 µl minta)	(100 nl/min- 5µl/min) 1.5 µl/min	>90%	2.8µm (3.4 x 10 ⁶ gyöngy per chip)	V-alak [H 50 µm]; 13°; mágnes NdFeB12 N50, 1.47 T) 30x20x20 mm ³)	~10 ⁻¹¹ N	[186]
RNS	PBS és vér lizátum	Dynabeads oligodT mágneses gyönggyel Ø=2,8 µm	4x 10 ⁴ gyöngy/ µl; 8 ng /µl mRNS megkötésére képes	20 ml/h	>80%	Nd-Fe-B permanens mágnes	2-2 be- és kimenet [W200 és 800 µm széles]; [H 50 és 10 µm]; ferromágneses nikkeltől 3 régióra osztva (folyásirány és a huzal közt bezárt szög (5,7°; 7,1°; 11,3°; 100 µm-ra ér véget a faltól)	0,14 T	[187]

14. táblázat Mágneses csapdázás fluidikai megoldásai változatos célmintára célzottan. Jelölés: hossz[L]; magasság[H]; szélesség[W]; távolság [D]; nem említett (n.m.)

13. Nyilatkozatok

D12

Nyilatkozat a munka önállóságáról, irodalmi források megfelelő módon történt idézéséről

**NYILATKOZAT
A MUNKA ÖNÁLLÓSÁGÁRÓL, IRODALMI FORRÁSOK
MEGFELELŐ MÓDON TÖRTÉNT IDÉZÉSÉRŐL**

Alulírott kijelentem, hogy a

.....
.....

című benyújtott doktori értekezést magam készítettem, és abban csak az irodalmi hivatkozások listáján megadott forrásokat használtam fel. Minden olyan részt, amelyet szó szerint, vagy azonos tartalomban, de átfogalmazva más forrásból átvettem, a forrás megadásával egyértelműen megjelöltem.

Budapest, 20.....

..... (aláírás)

Nyilatkozat a nyilvánosságra hozatalról
NYILATKOZAT A NYILVÁNOSSÁGRA HOZATALRÓL

Alulírott kérem,
hogy.....

.....

című doktori értekezésem interneten történő nyilvánosságra hozatala

- Korlátozás nélkül;
- Elérhetőség csak magyarországi címről;
- A fokozat odaítélését követően 2 év múlva, korlátozás nélkül;
- A fokozat odaítélését követően 2 év múlva, csak magyarországi címről történjen meg.

Budapest, 20.....

.....

aláírás

*a megfelelő választást kérjük aláhúzni