



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Villamosmérnöki és Informatikai Kar



BMEETT
ELEKTRONIKAI TECHNOLÓGIA TANSZÉK

Kamondi Noémi, Kovács Rebeka

Von Willebrand faktor aktivációjának vizsgálata mikrofluidikai rendszerekben

TDK Dolgozat

Konzulens:
Borók Alexandra
Doktorandusz

Témavezető:
Dr. Bonyár Attila
Egyetemi docens

Budapest, 2021.

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	4
2	Szakirodalmi áttekintés	5
2.1	A von Willebrand betegség	5
2.2	A von Willebrand faktor aktivációja	6
2.3	Folyadékok csőben való áramlásának jellemzése	9
2.4	Nyírófeszültség mérésének lehetőségei	12
2.5	Számítógépes folyadékdinamikai módszerek	12
2.6	Mikrofluidika	13
2.7	Alkalmazott anyagok	15
2.8	Gyártástechnológiai lehetőségek mikrofluidikai rendszerek kialakítására	16
2.9	Öntőformák kialakítása 3D nyomtatással	16
2.10	Sztereolitográfia (SLA) és Digital Light Processing (DLP)	17
3	Kísérleti eszközök és modellalkotás	19
3.1	A kísérlethez használt mikrofluidikai csatorna	19
3.1.1	Öntőforma 3D nyomtatása	19
3.1.2	Nyomtatási utómunkálatok	21
3.1.3	Az öntőformák tervezése	22
3.1.4	Az öntőformák megvalósítása	26
3.1.5	PDMS öntés	26
3.1.6	Bondolás	27
3.1.7	Mérés	28
3.2	Szimulációs módszerek	29
3.2.1	Y-alapú geometriai tervek	29
3.2.2	A második geometriai terv	31
3.2.3	A szimuláció részletezése	32
4	Kísérleti és szimulációs eredmények	34
4.1	Kísérleti eredmények	34
4.1.1	Az Y-csatornával végzett kísérlet	34
4.2	Szimulációs eredmények	36
4.2.1	Az Y-alapú kétdimenziós modell	36
4.2.2	Az Y-alapú háromdimenziós modell	39
4.2.3	Az új csatorna modellje	43
5	Összefoglalás	46
6	Feladatmegosztás	47
7	Köszönetnyilvánítás	47
8	Irodalomjegyzék	48

Rövidítések jegyzéke

CAD — Computer Aided Design

CNC — Computer Numerical Control

CFD — Computational Fluid Dynamics- számítógépes folyadékdinamikai módszerek

DLP — Digital Light Processing

FDM — Fused Deposit Modeling

LoC — Lab-On-a-Chip

LOM — Laminated Object Manufacturing

MEMS — Micro-Electro-Mechanical Systems

MJM — Multi Jet Modeling

PDMS — Polydimethylsiloxane — Dimetil-polisziloxán

PIV — Particle Image Velocity

POC — Point of Care

Si — Szilícium

SLA — Stereolithography/ Sztereolitográfia

TTP — Thrombotikus Thrombocytopeniás Purpura

vWB — von Willebrand betegség

vWF — von Willebrand factor/faktor

μTAS — micro-Total-Analysis-Systems

1 Bevezetés

Az egyik leggyakoribb, többnyire örökletes vérzékenységi rendellenesség a von Willebrand betegség (vWB), amely a kutatások alapján 10000-ból 1 embert érint [1]. Jellemző tünetei közé a bőr- és nyálkahártyavérzések, illetve műtétek során általában fellépő vérzések tartoznak. Gyermekkorban orrvérzés, fogínyvérzés formájában nyilvánulhat meg. Emellett a betegek bőrén apró, alig észrevehető traumák által okozott véraláfutások jelenhetnek meg; komolyabb problémát azonban a szülést követően kialakuló vérzékes komplikációk jelentik. A vWB a vérben megtalálható legnagyobb glikoproteinhez, a von Willebrand faktorhoz (vWF) köthető. A betegség hátterében ennek a fehérjének mennyiségében, illetve működésében fellépő hibák állnak. A vWF a vérzéscsillapítás (haemostasis) egyik kulcsreakciójában játszik nagy szerepet; a sérült érfal és a vérlemezkék közötti kötődést biztosítja és elősegíti a thrombocyta kitapadást. Nagy nyíróerejű áramlási viszonyok hatására végbemegy a kollagénhez történő adszorpciója; amely a faktor aktiválódásához, konformáció változásához vezet. A betegség diagnosztikájában a legelterjedtebb módszerek a faktor thrombocyta-kötő képességét vizsgálják; ilyen módszer például a riztocetin kofaktor által előidézett aktiválódás [2].

Kutatásunk során a vWF nyírófeszültség általi aktivációját vizsgáltuk egy általunk tervezett mikrofluidikai cellákban. A faktor működésének kontrollált áramlási körülmények közötti vizsgálatához többféle mikrofluidikai rendszert terveztünk, gyártottunk és teszteltünk. A 3D tervezett és nyomtatott mikrofluidikai csatorna öntőformáját PDMS-el (polidometil-sziloxánnal) öntöttük ki, majd hordozó felülethez bondoltuk (üveg, PDMS). A kutatás másik részében pedig, hogy pontosabb képet kapjunk a csatornarendszerben fellépő nyíróerőkről és áramlási viszonyokról egy multifizikai modellező környezetben szimulációkat végeztünk. A létrehozott csatornarendszerek optimalizálása számítógépes szimulációk és laboratóriumi mérések megvalósításával történt. A közös munka célja egy olyan mikrofluidikai eszköz kialakítása, amely segítségével meghatározhatjuk a von Willebrand faktor aktivitását különböző paraméterekkel rendelkező áramlási terekben.

A kutatómunkánkat a BME Elektronikai Technológia Tanszék Érzékelők és Mikrofluidika Laboratóriumában végeztük a Semmelweis Egyetem Haemostasis Laboratóriumával együttműködve.

2 Szakirodalmi áttekintés

Ebben a fejezetben kerülnek bemutatásra a szakirodalom azon területei, amelyek ismerete és megértése elengedhetetlenül fontos a kutatás céljának és eredményeinek megértése szempontjából. Elsőként a von Willebrand betegség, majd a betegséget kiváltó von Willebrand faktor működése kerül bemutatásra, nagy hangsúlyt fektetve a faktor aktivációjának a nyíróerővel való kapcsolatára. Kutatásunk kitér a folyadékok áramlását befolyásoló tényezőket, külön figyelmet szentelve a vér áramlásának tényezőire. Bemutatásra kerülnek a nyírófeszültség mérésének lehetőségei és a számítógépes folyadékdinamikai módszerek alapjai, továbbá részletezzük a mikrofluidikai rendszerek jelentőségét a téma szempontjából, valamint a munkánk során a mikrofluidikai cellák kialakítására alkalmazott PDMS (Dimetilpolisziloxán) tulajdonságait is. Végezetül a fejezet betekintést nyújt 3D nyomtatás technológiájába is.

2.1 A von Willebrand betegség

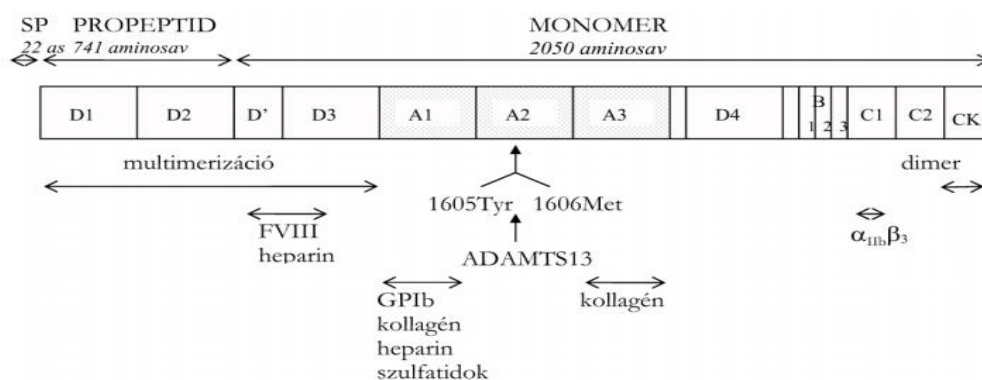
A leggyakoribb örökletes vérzési rendellenesség a von Willebrand betegség (vWB), melyet először Erik von Willebrand írt le 1926-ban. Amennyiben az emberi szervezet érrendszerét valamilyen mechanikai hatás – ütés, vágás – éri, úgy az erek megnyílhatnak és vérzés alakulhat ki. A trauma hatására szervezetünk védekezési mechanizmussal, úgy nevezett vérzéscsillapítással (haemostasis) reagál, amely több részfolyamatra bontható. Elsődleges szakaszában átmeneti helyi érszűkület (vasoconstrictio) jön létre. A második szakaszban a vérlemezkék (thrombocyták) kitapadása, aktiválódása és aggregálódása történik a sérült érszakaszon. Ezzel párhuzamosan indul el a harmadik szakasz, a véralvadás (koaguláció). Az alvadás eredménye, hogy a sérülés helyén a vérplazma oldott fibrinogénje oldhatatlan fibrinné alakul át és elzárja az érsérülést. A vörsejtek és a fibrinhálózat együttesen képezik a sérült eret elzáró alvadékot (koagulum). A folyamat tizenkét véralvadási faktor együttműködése által valósul meg [3], mely során a von Willebrand faktor (vWF) segíti a vérlemezkék közötti kötődést és thrombocyta kitapadást. A vWB hátterében az endotél sejtek és megakarocyták által termelt vWF szintjének csökkenése, vagy működésében fellépő hibák állnak [4]. A vWB nem csak örökletes formában, hanem szerzett betegségként, más alapbetegségekhez kapcsolódva is megjelenhet. Előfordulása nők és férfiak között ugyanakkora arányban jellemző.

A vWF struktúrájához, mennyiségéhez, funkciójához kapcsolódó hibák alapján a vWB három fő típusba sorolható [5]. A leggyakrabban előforduló 1-es típusnál a vWF mennyiségének csökkenése áll a betegség hátterében; ezzel szemben a 3-as típusnál a vWF teljes hiánya lép fel, ami súlyosabb tüneteket okoz, előfordulása azonban ritkább. A 2-es típus normális, vagy kis mértékben csökkent vWF szint mellett jelenik meg; itt a funkcionális károsodások állnak a háttérben. A 2-es típus további négy alkategóriába sorolható. A 2A altípus olyan betegség változatokat foglal magába, amelyek csökkent vérlemezke-adhézióval járnak, amit a nagy molekulatömegű vWF multimerok szelektív hiányossága okoz. A 2B altípus esetében a vWF nagy affinitással, spontán kapcsolódik a thrombocyta glikoprotein Ib-hez, aggregátumokat létrehozva, ami a faktor és a vérlemezke fokozott kiürüléséhez vezet. A 2M altípus funkcionális károsodást jelent normál multimer szerkezet mellett. A negyedik, 2N altípus a FVIII kötés károsodásával jár. [6]

2.2 A von Willebrand faktor aktivációja

A vWF egy multimer plazma-glikoprotein, amely egymással nagyjából megegyező, körülbelül 250 kDa nagyságú alegységekből épül fel. A nagy molekulatömegű vWF multimerok az endotélsejtek által a vérbe és a subendotéliumba választódva közvetítik a vérlemezke adhéziót az érrendszeri sérülések helyén. Emellett a faktornak a FVIII véralvadási faktor megkötése és stabilizálása, és szállítása is feladata [7].

A kb. 20000 kDa nagyságú protein szerkezetét négy ismétlődő domén alkotja; a D (4 típus), A (3 típus), C (6 típus), és CK; a különböző típusok jelölése számozással történik. A domének elrendeződését a 2.1. ábra mutatja [8]. Ezek megfelelő működése szükséges a faktor haemostasis feladatainak ellátásához; a FVIII keringésben való védelméhez, szállításához; a sérült érfalhoz való kötődéshez, és a sérülés helyén a thrombocyták megragadásához [9].

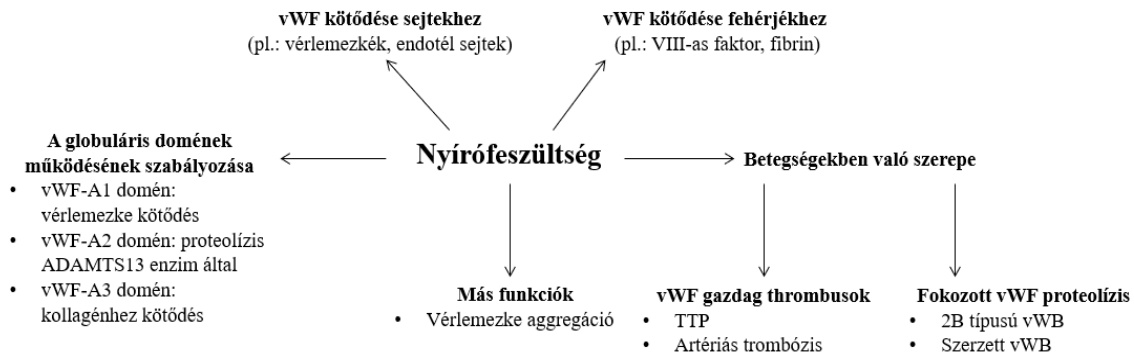


2.1. ábra A vWF szerkezete és kötőhelyei [8]

Nagy nyíróerejű áramlási viszonyok hatására történik a primer haemostasis működésének biztosítása. Az erekben áramló vér sebessége az érfaltól való távolság függvényében változik; középen a legnagyobb, majd fokozatosan csökken az ér falához közeledve. Ha a vérré, mint megszámlálhatatlan, egymással párhuzamosan elcsúszó rétegeként tekintünk, ezen rétegek között nyírófeszültség alakul ki. A rétegek közti sebességkülönbségből és távolságból eredő nyírási sebesség az érfal közelében a legnagyobb, ahol a nagyobb mennyiségű vörösvérsejt tömeg által a perifériára szorított vérlemezkék áramlása történik. Fiziológias körülmények között a legnagyobb nyírási sebességet az arteriolákban mérhetjük, ahol 500 és 5000 *l/s* között változik. Patológias körülmények között azonban akár 20–40000 *l/s* értéket is elérhet. [10]

A lassú áramlási tulajdonsággal rendelkező vénás rendszerben a kollagén, fibrinogén, fibronectin és a megfelelő thrombocytá felszíni receptorok közti kötés erőssége képes biztosítani a vérlemezkék adhézióját. Ezzel szemben nagy nyíróerő esetén a kötések nem teszik lehetővé az adhéziót; ilyen körülmények között válik elengedhetetlenné a vWF. A vérlemezkék glikoprotein Ib receptora és a subendothelialis struktúrák között kötés alakul ki; a thrombocyták sebessége lecsökken, a sérült érfal mentén lassú mozgást végeznek, miközben aktiválódnak. A felszínen egyéb receptorok megjelennek, és a szubsztrátjaikkal kialakuló kapcsolódás stabil adhéziót eredményez [11,12]. A nyírási sebesség növekedésekor (mikrocirkuláció területén, kisebb artériákban) az adhézió egyre inkább vWF-függővé válik. In vitro eredmények azt mutatják, hogy kb. 800 *l/s* nyírási sebesség felett a thrombocytá-adhézió 100%-ban a vWF által valósul meg [13]. A vWF mérete jelentős szerepet játszik, ugyanis minél több receptor-ligand kapcsolódás képes kialakulni, annál erősebb lesz a létrejövő kötés. A primer haemostasis elindításában tehát hatásosak a nagy multimerek.

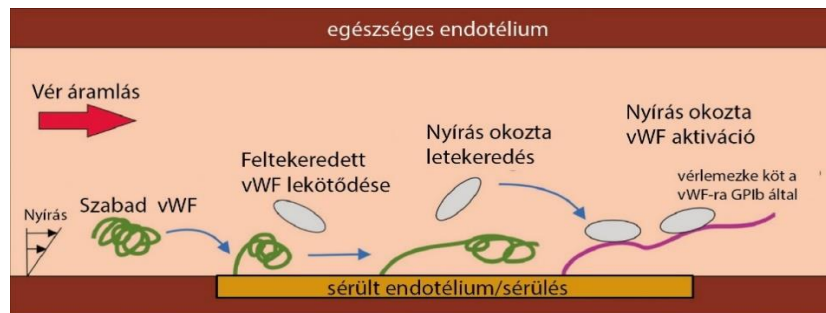
A keringésben normál körülmények között a vérlemezkék és a globuláris szerkezetű vWF nem lépnek egymással kapcsolatba; konformációváltozás szükséges a vWF-GPIb (glycoprotein Ib) kialakulásához. Fiziológias körülmények között a nagy nyíróerő, illetve a subendothelialis struktúrákhoz, kollagénhez való kapcsolódás képes ezt indukálni [14]. Sérülések esetén fellépő érösszehúzódkor megváltoznak az áramlási körülmények (folyadéksűrűlódás, nyírófeszültség; nyírási sebesség 5000 *l/s* felett [15]), amik a faktor megnyúlását eredményezik. A megváltozott konformációjú vWF az érfal felé sodródik, majd kitapad, és a globuláris forma helyett egy elongált formát vesz fel. [16,17]



2.2. ábra A nyírófeszültség és a vWF kapcsolata [18]

A nyírófeszültség ezen felül más módokon is hatással van a vWF-re (2.2. ábra). Hatására az addig globuláris formában lévő fehérje bizonyos doménjei működésbe lépnek, és betöltik funkcióikat (2.3. ábra). Emellett a multimer képes az endotél sejtek, plazma proteinek, vérlemezkék felszíni receptoraihoz kötődni, illetve más fehérjékhez is, mint például a VIII-as faktorhoz.

A vWF multimer óriás protein formában van jelen a keringésben, amely túlzott aktivitással rendelkezik, és egy ritka, de veszélyes betegséget okozhat; a thrombotikus thrombocytopeniás purpurát (TTP). Azonban a szervezetben található a vWF természetes inhibitora, az ADAMTS-13 enzim, amely a faktor A2 doménjében hasít, ezzel gátolva a thrombusok képződését. A nagy folyadéksúrlódás hatására több hasítás megy végbe, mert a faktor konformációváltozása szabaddá teszi az enzim számára az A2 domént [19,20].



2.3. ábra A von Willebrand faktor aktivációja [21]

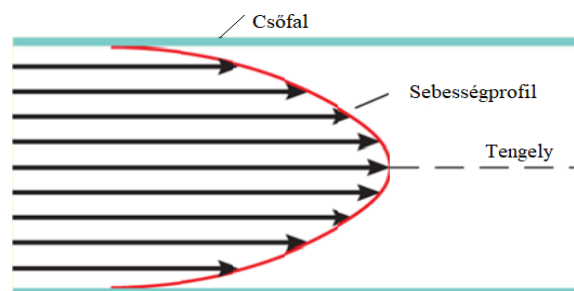
A vWF aktivációjában tehát kiemelkedően fontos a nyírófeszültség szerepe. A vWF viselkedésének vizsgálatára mikrofluidikai csatornarendszer ad lehetőséget, ugyanis a mikrofluidikai eszközök lehetővé teszik az összetettebb geometriai megvalósításokat, amik által pontosabban megvalósíthatók például az érrendszerre jellemző tulajdonságok is. A mikrofluidika tudományága a gázok és folyadékok (fluidumok) áramlásának vizsgálatával foglalkozik jellemzően olyan csatornarendszerekben, amelyeknek térfogatartománya a mikroliterestől (10^{-6} liter) pár száz mikroliteresig terjed, lehetővé téve a kis térfogatú minták (pl.: vérminták) analizését.

2.3 Folyadékok csőben való áramlásának jellemzése

Az emberi érhálózatot egyszerűsítve tekinthetjük egymásba folyó különböző keresztmetszetű csövek rendszerének. Csőben áramló folyadékok részecskéinek lineáris áramlási sebessége a cső egész keresztmetszetét tekintve változó. A cső közepén, a tengelyáramban mérhetjük a fellépő legnagyobb sebességet, amely a cső falához közelítve – a súrlódás következtében – egyre csökken. A cső falával közvetlenül érintkező folyadék réteg virtuális sebessége nulla. Az összes részecske sebességének átlaga az axiális sebesség és a zérus között van.

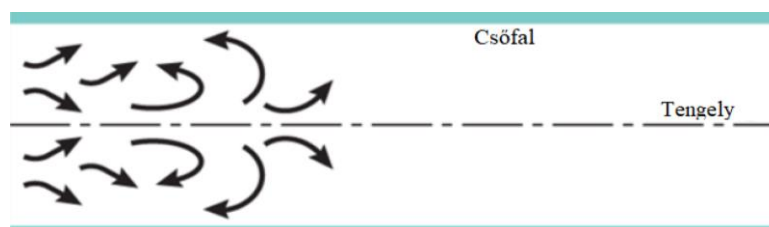
Lamináris áramlás esetén az egymáshoz képest eltérő sebességgel rendelkező részecskék végtelenül vékony koncentrikus rétegeket képeznek, a folyadék részecskék egymással párhuzamos áramlása a saját rétegükön belül úgy valósul meg, hogy nem lépnek át más rétegekbe, tehát nem történik egymással való keveredés. Ezáltal a sebességprofil egy előre irányuló parabola (2.4. ábra).

Ez a lamináris áramlás függ a maximális áramlási sebességtől (v [cm/s]), a folyadék viszkozitásától (η [$Pa \cdot s$]), sűrűségétől (ρ [g/cm^3]), és az ér átmérőjétől (d [cm]) [3].



2.4. ábra Lamináris áramlás és áramlási profil [3]

Turbulens áramlás esetén a folyadék rétegek nem egymástól függetlenül áramlanak, hanem a folyadék részecskék elmozdulnak, az áramlás tengelyével szöget bezárva áramlanak (2.5. ábra).



2.5. ábra Turbulens áramlás vázlatja a csőben [3]

Ez a turbulens áramlás akkor következik be, ha a Reynolds-szám átlép egy kritikus, 2000 feletti értéket [3]. A Reynolds-szám egy dimenzió nélküli szám, amely megadja a tehetetlenségi és viszkozus erők arányát [22].

$$Re = \frac{\rho * d * v}{\eta} \quad (1)$$

Az összenyomhatatlan, viszkozus folyadékok áramlásának leírására a Navier-Stokes egyenletet használjuk:

$$\rho * (u * \nabla) * u = \nabla * [-p * I + K] + F \quad (2)$$

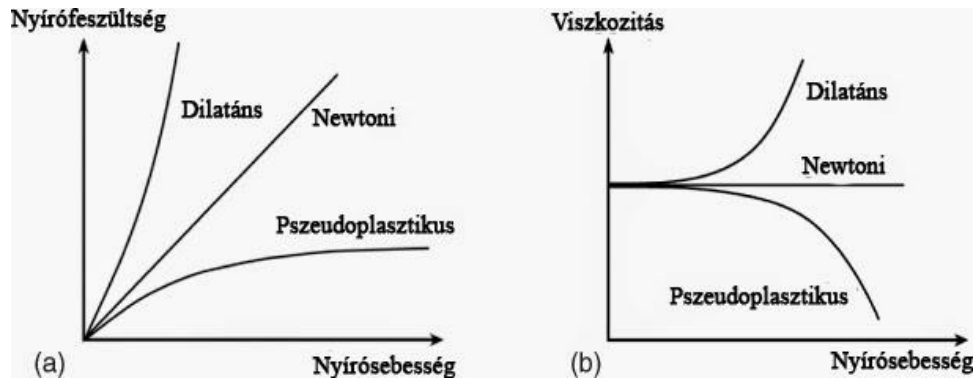
$$\rho * \nabla * u = 0 \quad (3)$$

$$K = \eta * (\nabla * u + (\nabla * u)^T) \quad (4)$$

ahol a sűrűség ρ [g/cm^3], a dinamikai viszkozitás η [$Pa \cdot s$], a folyadék áramlási sebessége u [m/s], a nyomás p [Pa], egységdiagonális mátrix I [-], a feszültség tenzor T [Pa], F [N] a folyadék egységnyi köbtartalmára vonatkozó erő, és ∇ a nabla operátor [23,24].

Lamináris áramlási körülmények között a folyadékok jellemzésére a nyírási sebesség és nyírási feszültség összefüggését vesszük alapul. Ez a kapcsolat a folyadékrétegek közötti belső ellenállást tükrözi; azaz a folyadék viszkozitását, amelyet úgy kapunk meg, ha a nyírófeszültséget elosztjuk a nyírási sebességgel. Reológiai szempontból két fő folyadék csoportot különböztetünk meg, melyeknek közös jellemzője a hőmérsékletfüggésük [25]:

- Newtoni folyadékok: a viszkozitás független a nyírási sebesség vagy nyírófeszültség változásától. Ezeknél a folyadékoknál a nyírófeszültség és nyírási sebesség viszonyának meredeksége állandó, így a viszkozitás állandó, csak a hőmérséklettől és a nyomástól függ. Folyásgörbéje egy egyenes melynek iránytangense az anyag viszkozitásának reciproka. Ebbe a csoportba sorolható a víz és a vérplazma (2.6. ábra).
- Nem-newtoni folyadékok: A látszólagos viszkozitás nem állandó, hanem függ a nyírófeszültségtől és nyírási sebességtől. Ide tartozik a vér, amely egy kétfázisú folyadék; a vérplazmán kívül tartalmaz sejtes elemeket. Viszkozitása a rá ható nyíróerőkön kívül függ a hematokrit értéktől is, amely a sejtes elemek számát adja meg (2.6. ábra).



2.6. ábra Jellemző folyás és viszkozitásgörbék [26]

A nyírófeszültség, nyírási erő (shear stress) az a tangenciális erő, amely egységnyi felszínre hatva elmozdítja egymáson a rétegeket. Jele τ , mértékegysége N/m^2 (Pa). A nyírási sebesség (shear rate) pedig az a sebesség, amivel az áramló folyadékok egymástól adott távolságban lévő rétegei elcsúsznak egymáshoz képest, jele γ , mértékegysége $1/s$. Lamináris áramlás esetén du/dx , ahol x a csatorna hossz tengelyére merőleges irány. A két mennyiség között egyenes arányosságot a dinamikus viszkozitás adja meg, melynek jele η , mértékegysége $Pa \cdot s$. [27]

Az 1. Táblázatban szemléltetem az érrendszer különböző szakaszaira jellemző átlagos áramlási- és nyírási sebesség értékeket, valamint a jellemző nyírófeszültséget.

1. Táblázat Az érrendszer szakaszaira jellemző átlagos paraméterek [28,29,3]

Érszakaszok	Érszakasz átmérők	Áramlási sebesség (m/s)	Nyírási sebesség ($1/s$)	Nyírófeszültség (Pa)
Aorta	2,5 cm	0,3	200	0,5-1,2
Artériák	2-0,1 cm	0,05	250	1-6
Arteriolák	20-200 μm	0,0025	1600	1-5,5
Kapillárisok	5-7 μm	0,00022	1300	1-4,5
Venulák	20-500 μm	0,00025	400	1,5
Vénák	0,15-1,5 cm	0,025	150	0,5-1,1
Venae cavae	1,5-3 cm	0,06	10	0,1

2.4 Nyírófeszültség mérésének lehetőségei

A mikrofluidikai eszközökben alacsony tehetetlenségi és gravitációs erők uralkodnak, tehát a nyírófeszültség válik a környezet meghatározó tényezőjévé. Ezáltal más mechanikai faktoroktól függetlenül vizsgálhatjuk a nyírófeszültség hatását. [30] A kísérletek során azonban a nyírófeszültség pontos mérése nehezen megvalósítható, erre általában különböző érzékelőket (nyúlásmérő bélyegeket [31], piezoelektromos érzékelőket [32], vagy kapacitív érzékelőket) használnak [33]. Habár a nyírófeszültség mérésére alkalmas eszközök ezek, méretük több centiméteres, ezért mikrofluidikai eszközökben nem alkalmazhatók [34].

A nyírófeszültség-eloszlása mikrofluidikai eszközökben vékony, rugalmas mikropillérek elhajlása alapján mérhető [35], azonban ezek befolyásolják a kapott nyírófeszültség értékeket. Ezért ez a módszer nem minden esetben eredményes. Ezekben az esetekben az általunk is használt végeses elemes folyadékdinamikai szimulációs módszerek (Computational Fluid Dynamics- CFD) alkalmazhatók az összetett geometriák esetén [36] [37].

Közvetett nyírófeszültség mérésként alkalmazható a Particle Image Velocimetry (PIV, részecske-képen alapuló sebesség meghatározás), amely egy pillanatnyi, kétdimenziós sebesség-képet állít elő az áramlásról. Az így kapott térbeli felbontás és mérés pontosnak tekinthető, azonban hátránya, hogy költséges eljárás. A mért sebességértékek ezután számos utólagos számításához használhatóak, beleértve a sebességgradienst, a sebesség nagyságát és irányát meghatározó számításokat, és a nyírófeszültséget [38]. A CFD használatával lehetővé válik a folyadék mozgásának, viselkedésének rekonstruálása annak érdekében, hogy a mikrofluidikai cellában létrejövő áramlási körülményeket jobban megismerjük [39].

2.5 Számítógépes folyadékdinamikai módszerek

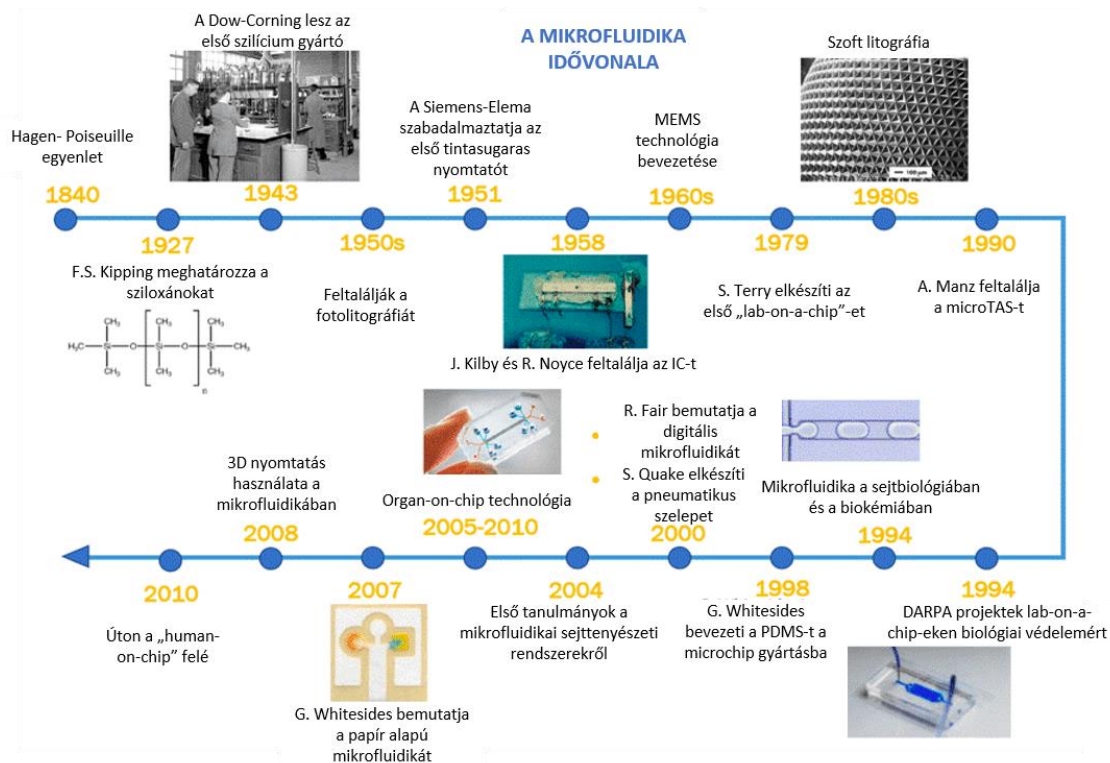
A számítógépes folyadékdinamikai módszerek különösen hasznosak a mikrofluidikai áramlási viselkedések tanulmányozásában; az alapkutatások területén, valamint a pontosabb eszközök tervezési folyamataiban. Segítségükkel gyorsan és költséghatékonyan meghatározhatóak a kialakított csatornában létrejövő folyadékáramlási viszonyok, az áramlási sebesség és a nyírófeszültség kapcsolata. A 3D tervezés nagy előnye, hogy a geometria kialakítása az igényeknek megfelelően könnyen változtatható, újratervezése gyorsan kivitelezhető, így az esetlegesen felmerülő hibák kijavítása gyorsan megvalósítható, ami által a fejlesztés ideje jelentősen lecsökkenhet.

A Comsol Multiphysics szoftver 2010 óta tartalmaz egy áramlásmodellezésre alkalmas CFD modult [40], amely végeselemes módszerrel dolgozik. A munkavégzéshez szükséges geometria megalkotható a programon belül, illetve könnyen átimportálható más program által tervezett geometria is. A peremfeltételek és különböző paraméterek megadását a hálózás követi, majd az eredmények kiszámítása. Számos mikrofluidikai eszköz modellezésére alkalmazzák kutatócsoportok ezt a programot, például Ray és munkatársai mágneses térbe helyezett mikrocsatornában vizsgálták egy összetett kétdimenziós kétfázisú modellben végbemenő ferrofluid cseppképződését [41]. A program által használt végeselemes módszer segítségével könnyebb a különböző fizikai modellek egymásra építése az egységes számítási háló alkalmazásával. [42]

2.6 Mikrofluidika

A mikrofluidika tudománya a fluidumok (gázok és folyadékok) manipulációjával foglalkozik mikroliteres (mm^3) tartományban. Tekinthető a reológia egy altudományának is, hiszen azok az általános egyenletek, melyekkel nagyobb mérettartományokon leírható a folyadékok viselkedése, itt is igazak; azonban a folyadékok fizikája eltérően viselkedhet (pl. makroszkópikus méreteknél a turbulens áramlás jellemzőbb, a mikrofluidikai áramlások szigorúan laminárisak). [43]

A mikrofluidika megjelenése az 1970-es évekre tehető, bár az 1950-es évektől már nőtt az érdeklődés a miniatürizált rendszerek és alkatrészek iránt, annak köszönhetően, hogy félvezetőkön sikerült háromdimenziós mintázatokat létrehozni. 1970 óta a tudomány jelentős fejlődésen esett át (2.7. ábra), mind fizikai, kémiai és biokémiai kutatásokban, mind a nanotechnológiában és biotechnológiában előszeretettel alkalmaznak mikrofluidikai chipeket. Biotechnológiában a legfontosabb szerepe az ún. lab-on-a-chip-eknek és DNS chipeknek kialakításában van. [44,45]



2.7. ábra A mikrofluidika fejlődése [45]

Mikrofluidikai rendszerek alkalmazásával nagy érzékenyséű, nagy reakcióidejű és alacsony költségű eszközöket hozhatunk létre fluidumok vizsgálatához. Kis méretüknek köszönhetően előnyös tulajdonságuk, hogy hordozhatóak, kevesebb reagenst igényelnek a különböző vizsgálatokhoz, olyan analízisek is kivitelezhetőek segítségükkel, amelyekhez egész laboratóriumokra lenne szükség; illetve akár párhuzamosan is lehet méréseket végezni ilyen eszközön az integrált érzékelőktől függően. Mikrofluidikai eszközök használata egyaránt megfelelő precíz, költségesebb laboratóriumi vizsgálatok kiváltásához és az alkalmazás helyszínén használt (POC- Point of Care) olcsóbb, tömeggyártott cellák készítéséhez is. Precíz és kifinomult rendszerek hozhatók létre, mivel az összetett csatornarendszerek mellé pumpák, keverők, szelepek, de akár különböző típusú érzékelők (nyomás, hő, optikai, bio) is beépíthetők. Hátránya, hogy az eszköz anyagának tulajdonságai, illetve az eszköz tisztasága is meghatározóbb, mint a makroszkópikus méretű eszközök esetében, ezért az egyik legfontosabb szempont egy mikrofluidikai eszköz tervezésénél a használathoz megfelelően kiválasztott anyag. [45]

2.7 Alkalmazott anyagok

Amennyiben a mikrofluidika tudományág történelmét tekintjük, megállapíthatjuk, hogy az a mikroelektronika fejlesztéséből származtatható. Mikroelektronikában a szilícium volt a legelterjedtebb szubsztrát, így kezdetben mikrofluidikai eszközök fejlesztésére is ezt az anyagot használták. Az, hogy a szilícium már jó ideje használatban volt és így bejáratott feldolgozási és alakítási technológiák álltak rendelkezésre, nagyban hozzájárult a tudományág gyors fejlődéséhez. Ma a szilíciumot már kevésbé alkalmazzák, hiszen más anyagokhoz viszonyítva költségesebb, emellett nem átlátszó, ami megakadályozza az optikai detektálást, valamint az anyaggal való munkálatok tisztaszobát is igényelhetnek. [45]

Hogy kompenzálják ezen negatív tulajdonságokat, más anyagokkal kezdtek kísérletezni. Így lett elterjedt az üveg, illetve különböző polimerek (PMMA: polimetilmetakrilát, PS: polisztirol, PC: polikarbonát, PDMS: polidimetil-sziloxán) mikrofluidikai rendszerek létrehozásához. A polimerek alkalmazásának általános előnyei itt is érvényesülnek; robusztusak, olcsók, nagy választékban elérhetők, kémiaileg egyszerűen módosíthatók.

Ahogy korábban is említésre került, a PDMS a legnépszerűbb és legelterjedtebb alapanyag a mikrofluidikában főként, mert olcsóbb a többi alapanyagnál és sok alapos kutatás áll rendelkezésre a témában. [46]

A PDMS egy szilícium alapú szerves polimer, kémiaileg inert, biokompatibilis, biológiailag lebomló, nem gyúlékony, könnyen önthető és egyszerűen alakítható [47]. Jól kombinálható más anyagokkal (pl. nanorészecskék beültetésével, keveréssel, kompozit rétegek kialakításával), így alkalmazás szempontjából kedvező mechanikai, optikai, termikus és elektromos tulajdonságok érhetők el [48]. Bizonyos anyagok molekulái azonban képesek belediffundálni, ami felhasználástól függően előnyös, illetve hátrányos tulajdonság is lehet. PDMS-sel kihasználhatjuk a hagyományos öntés előnyeit: ha rendelkezésre áll egy például 3D nyomtatott öntőforma, ami újra és újra felhasználható, olcsó, gyors és könnyű vele ugyanazt a rendszert reprodukálni. [46]. Nagy előnye még, hogy üveghez és önmagához irreverzibilisen bondolható hozzáadott anyag nélkül [49].

2.8 Gyártástechnológiai lehetőségek mikrofluidikai rendszerek kialakítására

A mikrofluidikában használatos gyártástechnológiákat három nagy csoportba lehet osztani: szubtraktív technológiák, additív technológiák és öntés. Az első mikrofluidikai eszközöket szubtraktív technológiákkal (pl.: marással) készítették szilíciumból és üvegből, olyan módszerekkel, amelyeket a mikroelektronikai chipék készítésénél fejlesztettek ki. Később egyre elterjedtebbé vált a CNC (computer numerical control) marás és a lamineted object manufacturing (LOM) csatornák létrehozásához.

Additív gyártástechnológiák közé soroljuk a 3D nyomtatást. Ezek kombinációival és a rohamosan fejlődő technológiával, rendelkezésre álló hardverrel gyorsan, költséghatékonyan állíthatunk elő háromdimenziós mikrofluidikai rendszereket. [47]

2.9 Öntőformák kialakítása 3D nyomtatással

A 3D nyomtatás egy olyan technológiai folyamat, melynek során rétegről rétegre haladva készül el a kívánt objektum, az új réteg mindig az előző rétegre épül fel. A hagyományos gyártástechnológiák, mint forgácsolás, marás, esztergálás során egy tömbi anyagból alakítják ki a kívánt formát, ami drága szerszámot és nagy szakértelmet vagy akár köztes gyártási lépéseket igényel és jelentős anyag veszteséssel és akár sorja keletkezéssel is járhat. Ezekkel az eljárásokkal szemben a 3D nyomtatás legnagyobb előnye, hogy nincs szükség hozzá plusz eszközökre pl.: öntőforma, maszk, és mivel rétegenként épül fel a termék, így a felhasznált anyag mennyiség pontosan (vagy megközelítőleg pontosan) annyi, amennyire a modell kialakításához szükség van. [50]

A 3D nyomtatás általános folyamata során szükség van egy 3D CAD (Computer Aided Design) modellre, amit ezután egy erre alkalmas szoftverrel digitális szeletekre vágunk, amely file így már a 3D nyomtató által feldolgozható, és legyártható vele. A technológiát általánosan prototípus gyártásra és kis sorozatszámú termékek legyártására használják. Ezen felül sok lehetőség rejlik benne a mikrofluidikai csatornák öntőformájának legyártásában.

A legismertebb 3D nyomtatási eljárás az FDM (fused deposition modeling), azaz a szálhúzáson alapuló módszer. Használat során a gépbe az anyag egy tekercsről letekerhető szál formájában kerül be (ún. filament). A filament folyamatosan adagolódik a nyomtató fejébe, amely a benne található fűtőszállal megolvastja azt, és a rászertelt fűvókán keresztül extrudálja az anyagot. Ezt követően a nyomtató fej a kívánt keresztmetszeret kialakítja a tárgyasztalon.

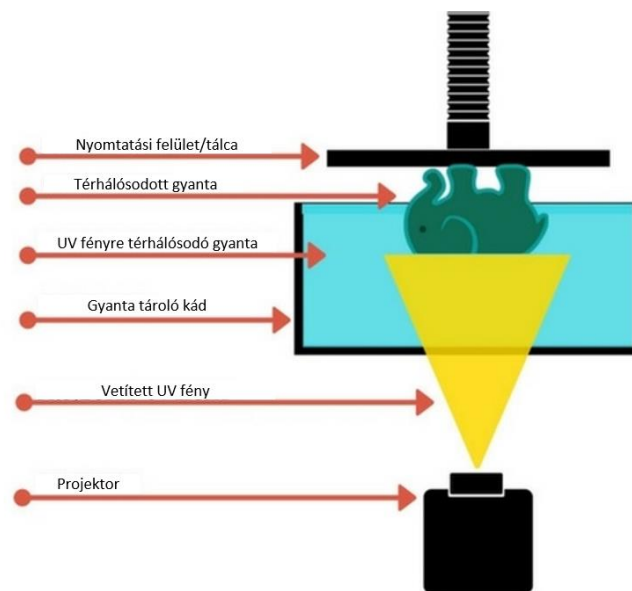
Egy másik módszer a Multi Jet Modeling /Polyjet (MJM), amely technológiához alapanyagként fotoreziszt gyantára van szükség. A gyanta itt egy tintasugaras nyomtatófejből

csepp formájában kerül terítésre a tárgyasztalon. Ezután a felvitt anyagot a mozgó nyomtatófejre erősített UV fényforrás keményíti ki [47].

Munkánk során mi egy másik 3D nyomtatási technológiát, a sztereolitográfiához nagyon hasonló, DLP (Digital Light Processing) technológiájú nyomtatót alkalmazunk.

2.10 Sztereolitográfia (SLA) és Digital Light Processing (DLP)

A sztereolitográfia (SLA) egyik legkorábbi és legismertebb 3D nyomtatási technológia. Hozzá nagyon hasonló technológia a Digital Light Processing (DLP); a két technológia csak a fényforrásában tér el egymástól. Alapanyagként valamilyen fény hatására megkötő gyantát alkalmaz, ami a nyomtató gyantatartó edényébe helyezhető. Nyomtatás során a tárgyasztal belemerül a gyantatartó kádba, a megvilágító kijelzőtől egy réteg távolságra. A nyomtatókban fényforrás SLA technológia esetében általában kék lézer, míg DLP esetében UV fényforrás. SLA esetében a lézertény „kirajzolja” a keresztmetszeti réteget, míg DLP esetében egy LCD (Liquid-Crystal Display) kijelző kivetíti a kialakítandó keresztmetszeti geometria negatívját, mint egy fényáteresztő maszk viselkedik. Ezután a nyomtató UV fényrel megvilágítja a gyantát, ami ennek hatására polimerizálódik (2.8. ábra). Ezután a tárgyasztal feljebb emelkedik egy réteggel és megkezd a következő réteg kialakítását. [50]



2.8. ábra DLP nyomtató működési elve [50]

DLP technológián alapuló nyomtatóban a modell méretének a kivetíthető pixelek száma szab határt az x-y síkon, míg magasságának a z tengelyre erősített motor mozgató tartománya [47]. A technológia nagy előnye, hogy a nyomtatók már 150-200.000 Ft értékben megvásárolhatóak, a gyanták pedig literes kiszerelésben ennek körülbelül tizedébe kerülnek.

A komplett mikrofluidikai csatorna rendszert 3D nyomtatással is legyártható, habár a folyamat végén a gyantát ki kell tisztítani a csatorna rendszerből, illetve a biokompatibilis gyantákat szükséges alkalmazni (pl.: PEG-DA-258 (258 molekulatömegű poli(etilén-glikol)-diakrilát) [47]. Ennél célszerűbb a 3D nyomtatott modelleket öntőformaként alkalmazni; ilyenkor a csatornarendszerek negatívjának nyomtatása történik.

3 Kísérleti eszközök és modellalkotás

Az alábbi fejezetben kerül bemutatásra a 3D nyomtatott mikrofluidikai csatorna öntőformájának elkészítése és a kísérlet alapjai. Ezután a számítógépes szimuláció megvalósításának lépéseit és hátterét szemléltetjük; először a 2D, majd a 3D geometriai terveken végzett modellezést.

3.1 A kísérlethez használt mikrofluidikai csatorna

Ebben a fejezetben kerül részletezésre, milyen módon lettek létrehozva a vizsgálatok során alkalmazott mikrofluidikai cellák és hogyan lettek legyártva 3D nyomtatással az ezekhez szükséges öntőformák.

3.1.1 Öntőforma 3D nyomtatása

A csatornarendszer elkészítéséhez 3D nyomtatott öntőformákat használunk. A 3D nyomtatás az Anycubic Photon Mono X nyomtatóval történt, ami egy DLP technológia elvén működő eszköz (3.1. ábra).

A modelleket először meg kell tervezni, ehhez egy CAD szoftver szükséges, ami jelen esetben az Autodesk Inventor CAD program.

A megtervezett, legenerált modellt „.stl” kiterjesztésben szükséges elmenteni, majd a nyomtatóhoz mellékelt Photon Workshop 64 program segítségével a nyomtató számára feldolgozható „sliced” fájl kell generálni, hogy a nyomtató a modellt keresztmetszeteiben lássa, és így rétegről rétegre fel tudja azt építeni. A szoftver a modellt beolvasás után tehát megadott vastagságú rétegekre szeleteli Z-tengely mentén. Ebben a programban állítható továbbá a bázis rétegek száma, és kezelési ideje, illetve a normál rétegek kezelési ideje is.



3.1. ábra A 3D nyomtató és részei [51,52]

Mivel a nyomtatásokhoz alkalmazott gyanták meglehetősen mérgezőek, fokozottan ügyelni kell, hogy ne érintkezzen bőrrel és szembe ne kerüljön, ha azonban ez mégis megtörténik, azonnal le kell mosni, el kell távolítani az érintett területről, illetve, ha szembe kerül ajánlott orvoshoz fordulni. A munkavédelmi szabályok betartása kötelező, ezért minden esetben gumikesztyűt kell használni, munkavédelmi maszkot kell viselni, illetve fontos az elszívó berendezést is üzemelni, amíg a nyomtatóval és gyantával dolgozunk. A fenti követelmények nélkül a nyomtató alkalmazása szigorúan tilos.

Első lépésként, le kell venni a „Top Covert”, ami egy UV fény ellen védő, sárga burkolat. Nyomtatás előtt szintezni kell a nyomtatási platform helyzetét, hiszen az minden nyomtatás után eltávolításra kerül, és csak így biztosítható, hogy teljesen párhuzamos legyen az LCD kijelzővel. Ehhez először a tálcát rögzítjük a Z tengelyen mozgó karra és a szintező csavarokat kioldjuk, majd a kijelzőtől egy papírlap távolságyira a újra kalibráljuk a tálca $Z=0$ értékét.

Ezt követően rögzítjük a gyanta tartó tálcát csavarokkal, majd feltölthetjük azt a kívánt mennyiségű gyantával. Ezután visszatehető a burkolat és a pendrive-ról kiválasztva a nyomtatandó modell fájlt, elindítható a nyomtatás.

A gép kezelése nagyon egyszerű, hiszen egy érintőképernyő segítségével történik. A nyomtatás ideje a térhálósítás beállított idejétől, illetve, a modell Z irányú méretétől nagy mértékben függ. A kijelzőn végig követhető, hogy a nyomtatás épp hányadik rétegnél tart és mennyi a becsült hátralévő idő. Ha végzett a nyomtató, ismét el kell távolítani a takaróelemet, majd lecsavarozni a nyomtatási tálcát, amin már megtalálható a kinyomtatott minta. Ezeknél a lépéseknél elengedhetetlen a gumikesztyű használata, hiszen a nyomtató tálca – a technológiai alapelveknek megfelelően – folyamatosan fel-le mozog a gyantatartó kádban, így a nyomtatás végére a gyanta teljes egészében beborítja azt. Mielőtt leemeljük a tálcát a helyéről, érdemes egy gumis spatulával óvatosan lehúzni a rajta maradt gyantát, így egyrészt minimalizálható az alapanyag veszteség, másrészt, ez a nyomtató tisztítását is lényegesen megkönnyíti.

Ezt követően a kinyomtatott minta eltávolítása következik a tálca felületéről. Ehhez egy vékony, éles penge bizonyult a leghatékonyabbnak, azonban körültekintőnek kell lenni, hiszen a tálca felülete meglehetősen sérülékeny.

3.1.2 Nyomatási utómunkálatok

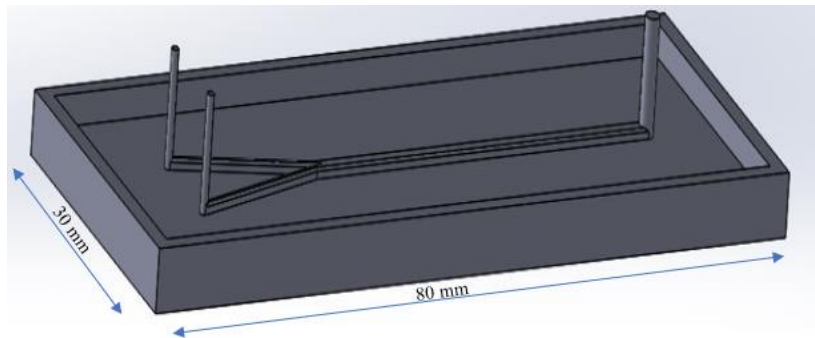
A nyomtató mellé ajánlott egy utókezelő berendezés használata, ami jelen esetben az Anyubic Wash & Cure állomása. Az eszköznek két funkciója van; egyfelől képes egy hozzá tartozó mágneses keverővel ellátott edény segítségével keverőként funkcionálni, másfelől pedig beépített UV lámpasor alkalmazásával utólagos térhálósítást is meg tud valósítani. Ennek megfelelően először a nyomtatott modellek egy alkoholos mosásra kerülnek be legalább 10 percre, majd a mosó edényt forgó tálcára cserélve egy utó-UV kezelést is adhatunk az eszközzel a modellnek. Az utó-UV kezelés előtt a tapasztalatok alapján érdemes tiszta vízzel is lemosni, majd szárazra törölni a formákat. A 3D nyomtatott öntőformákat ezen felül javasolt utólagosan hőkezelní (ábra); 80 °C-os kemencébe kerülnek, 10-15 perces időtartamra. Erre a lépésre azért van szükség mert a formából ilyenkor még különböző anyagok párolognak ki magasabb hőmérsékleten, amik a PDMS térhálósodását megakadályozzák. Ilyen esetben a PDMS felülete érdessé, mintázottá válhat, ami a mikrofluidikai alkalmazásokat kizárja, rosszabb esetben a PDMS nem távolítható el épségben az öntőformáról, berepedhet, elszakadhat, ez által használhatatlanná válik.



3.2. ábra Egy kész 3D nyomtatott öntőforma

3.1.3 Az öntőformák tervezése

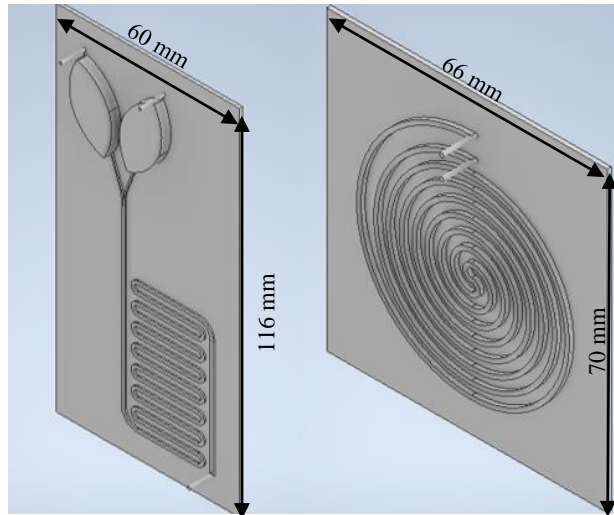
A modellek kialakításánál a fő szempont az volt, hogy olyan áramlási tér kerüljön kialakításra, amelynek egyik bevezető csatornájában a Semmelweis Egyetem által biztosított vWF-t tartalmazó vérplazma minta és puffer oldat keveréke áramolhat, másik bevezető csatornájában pedig a latex reagens. Ennek a két csatornának egy közös csatornába kell összefolynia, hogy a két folyadék között nyírófeszültség jöhessen létre és aktiválódhasson a vWF. Így készült el az első csatornageometria öntőformája (3.3. ábra).



3.3. ábra Az első öntőformáról készített 3D modell

Az első mérés alkalmával azonban további szempontok és problémák merültek fel, amik orvoslására módosításokat kellett végrehajtani a modellen.

Mérés közben a legkritikusabb pont az összefolyás. Nagyon fontos, hogy az Y két ágából egyszerre érkezzenek meg ide a folyadékok. Ha ez nem teljesül, előfordul, hogy egyik vagy másik folyadékból nagyobb szakasz(ok) túl gyorsak vagy épp lemaradnak, így csökkentik a keveredő anyagmennyiségeket, ezzel veszélyeztetve a kísérlet sikerességét. Ugyanennyire fontos, hogy a csatornarendszerbe ne kerüljön levegő buborék, szintén az előbb említett okból. Azért, hogy a mérés indításának pillanatában ez az állapot létrejöhessen, a befolyó csatornák egy-egy tartállyal lettek kiegészítve. A Semmelweis Egyetem kollégáinak javaslatára egy keverő rendszer is elhelyezésre került, hiszen a két folyadéknak szükséges homogéneen elkeverednie (3.4. ábra, bal), hogy a vWF aktiválódni tudjon. A modellhez ezen felül készült egy másik, különálló rész is; ez egy úgy nevezett keringető (3.4. ábra, jobb). Ennek feladata az inkubáció. Átvezetés után az aktiválódott, összekeveredett minta két percen keresztül 37°C-on kering, egy perisztaltikus pumpa segítségével.



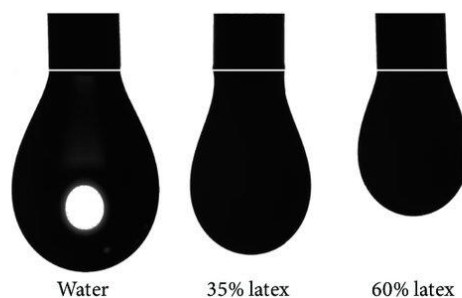
3.4. ábra A kibővített csatornarendszer 3D modellje; bal: aktivációt és keverést elvégző mikrofluidikai cella öntőforma modellje; jobb: keringető modellje



3.5. ábra A tartályokba töltött víz és latex viselkedése

Az egyetemi laborban a mikrofluidikai rendszerek tesztelésére desztillált víz állt rendelkezésre, amivel az új geometriák tökéletesen működtek. A következő Semmelweis egyetemi labor mérésnél derült ki, hogy mind a latex reagens, mind a puffer anyag habosodnak (3.5. ábra), így a tartályok feltöltésénél rengeteg levegő került a rendszerbe, ami a mérés sikeres kimenetelét akadályozta.

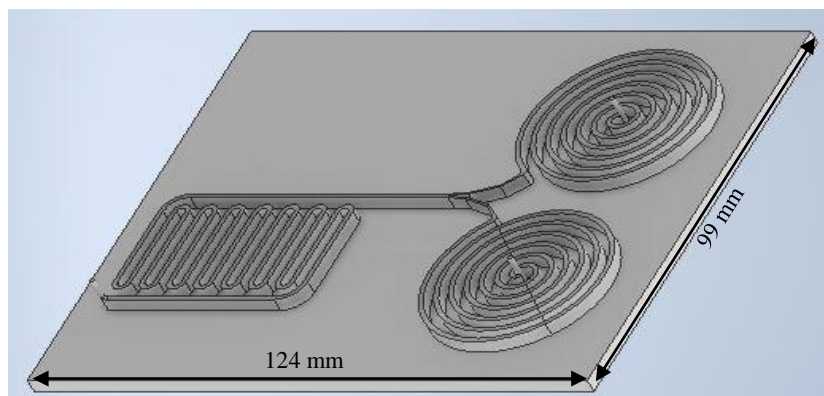
Liquids	Density (g/mL)	Surface tension (mN/m)
Water	0.99 ± 0.02	72.9 ± 0.2
35% latex	0.92 ± 0.04	44.2 ± 0.8
60% latex	0.87 ± 0.08	35.4 ± 0.7



3.6. ábra Víz, 35%-os latex és 60%-os latex függőcseppjeinek alakja

Aoythip Chunlok és kutatótársai kísérletükben víz, 35%-os és 60%-os latex (ipari standard érték) cseppek felületi feszültségét vizsgálták [53]. A felületi feszültség megmutatja, hogy a folyadékfelszín területegységgel való megnöveléséhez mekkora energiaváltozás szükséges. A 3.6. ábra táblázatában látható, hogy a 60%-os latex felületi feszültsége fele a vízének.

Teszteléssel az a következtetés volt levonható, hogy 1 mm széles csatornába töltve kiküszöbölhető a betöltött anyagok buborékosodása, így a tartályok helyére a keringetőben már bevált geometria került integrálásra. Az újratervezett modell a következő ábrán látható (3.7. ábra).

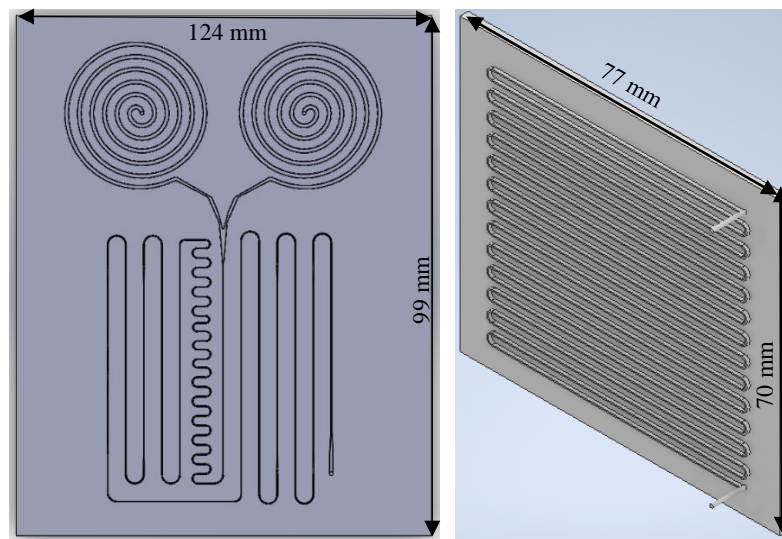


3.7. ábra Az átalakított tartályú csatornarendszer öntőformájának modellje

Ez a geometria tükrözi számos előző kísérlet eredményeit, azok következtetéseit alapján többszöri újra tervezéssel alakult ki a felmerülő igényeknek megfelelően. Kisebb problémák akadtak a be- és kiömlőnyílásokkal, 10-15 mérés után a portok elkezdtek kitágulni, emiatt szivárgás lépett fel. Ha egy cella ennél többször kerül felhasználásra, a jövőben ezt valamilyen módon ki kell küszöbölni. A csatornarendszerben azonban a vWF faktor nem aktiválódott. A szimulációs eredmények is azt mutatták, hogy a folyadék nem áramlik megfelelő sebességgel ahhoz, hogy elég nagy nyírófeszültség jöjjön létre, ami a vWF faktort aktiválja. Ennek következtében a geometriát ismét újra kellett gondolni.

A szimulációs eredményekből kiderült, hogy a csatornában az áramlási sebesség és a fellépő nyíróerő egyenes arányosságban állnak, ezért a cél az volt, hogy az áramlási sebességet minél jobban megnöveljük. A csatorna keresztmetszete ezért drasztikusan le lett csökkentve, illetve további „szűkítők” lettek elhelyezve, hogy a sebességet még jobban megnöveljék. Mivel a csatornarendszer alapterülete már közel 12 cm x 10 cm volt, ezeken a méreteken nem változtattunk, az új geometria ugyanekkora alapra lett tervezve. A keverő rendszer is átalakításra került, több hosszú, egyenes szakasz került integrálásra, hogy a nyíróerő minél

jobban érvényesülni tudjon. Ugyanebből az okból az inkubációs „keringető” szakasz is át lett tervezve. A legújabb mikrofluidikai rendszert a 3.8. ábra szemlélteti.



3.8. ábra Az aktuálisan használt rendszer öntőformája (bal) és a keringető 3D modellje (jobb)

A szimulációs eredmények alapján azonban a kialakított csatornarendszer ebben a formában nem működőképes. Az összefolyásnál a csatorna keresztmetszete 2 mm-ről csökken 0,3 mm-re 5 mm hosszú úton. A két tartályból a beáramlási sebesség különböző, a nagyobb sebességű folyadék nem engedi az összefolyásba a kisebb sebességű folyadékot. Ez a szimulációs eredmények részletezésénél jól megfigyelhető. A validációs mérés során a mikrofluidika valóban nem működött. Tovább nehezíti a helyzetet, hogy az eddigi 1 mm-es csatornaszélességet 0,3 mm-re csökkentettük. Az 1 mm átmérőjű csatornával könnyebb dolgozni, mert jobban láthatóak benne a folyadékok és kisebb a sebesség, emiatt a feltöltés is könnyebb. Megoldás lehet a két folyadék azonos sebességgel való indítása, a kisebb folyadék mennyiséget szűkebb, a nagyobb anyagmennyiséget szélesebb csatornán vezetjük az összefolyáshoz.

3.1.4 Az öntőformák megvalósítása

A 3D nyomtatott geometria tartalmazhat alapot, de állhat csak a csatornageometriából is. Az előbbi típusúakat nyomtatás – és a korábban említett utómunkálatok – után egyből lehet alkalmazni. Ezen öntőformáknál figyelembe kell venni, hogy sajnos vetemedésre hajlamosak, és mivel a PDMS átveszi a geometria sajátosságait, ezért a forma görbülete is észrevehetővé válhat a térhálósodott anyagon. A PDMS-ből készült mikrofluidikai csatornarendszer üveghez való bondolása esetén ez a görbület megakadályozhatja a kötések kialakulását, felszakíthatja azokat, így a rendszert teljesen használhatatlanná téve. Amennyiben a PDMS alapú csatorna egy másik PDMS felülethez kerül bondolásra, az anyag rugalmasságából adódóan és a kialakuló kötések erőssége miatt a vetemedésből adódó deformáció elhanyagolható. Fontos érv még az alappal nyomtatott geometria mellett, hogy az öntőformák többször felhasználhatóak.

Amennyiben a csatorna alap nélkül kerül nyomtatásra, a geometriát egy üveglapra kell ragasztani, hogy használható legyen öntőformaként. A megfelelő ragasztó kiválasztása és a ragasztás megvalósítása azonban kihívást jelentenek. Előnye viszont, hogy a PDMS felülete az üvegnek köszönhetően tökéletesen sík, felületi minősége hibátlan, ebből adódóan a bondolás minősége is jelentősen javul. Ebben az esetben szükség van egy plusz keretre, ami 4 szorítóval kerül rögzítésre az üveglaphoz. A módszer hátránya, hogy a ragasztó nagy mértékben befolyásolhatja a PDMS térhálósodását, felületi minőségét, illetve egy öntőformával egy öntés végezhető el.

Három fotoreziszt gyanta kipróbálása után sikerült olyan gyantát találni, amivel a geometria alappal történő nyomtatása esetén a vetemedés elhanyagolható, tartós, ellenálló öntőformák hozhatók létre, melyek alkalmasak többszöri öntésre is. Idővel fárad az anyag a PDMS hőkezelése miatt, keletkezhetnek rajta kisebb-nagyobb mechanikai sérülések, de egy öntőformával 5-10 öntés is megvalósítható. Mivel az újratervezések során, a csatornarendszer egyre nagyobb lett, praktikusabb döntés volt a kiöntött fluidikát üveglap helyett PDMS felületre bondolni.

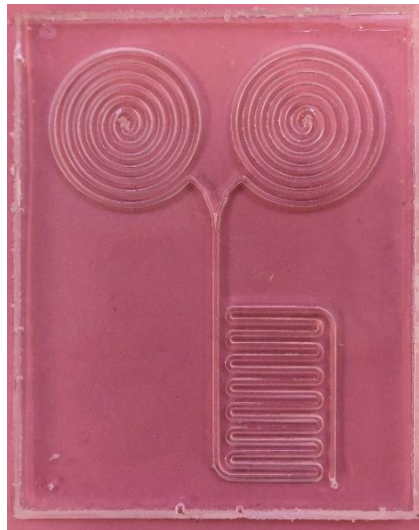
3.1.5 PDMS öntés

SYLGARD® 184 SILICONE ELASTOMER KIT felhasználásával a PDMS térhálósítószerrel és a monomert 1:10 arányban kimérjük és összekeverjük. Keverés közben a még nem térhálósodott PDMS-be levegő keveredik. A buborékok eltávolítása érdekében a keveréket vákuum kamrába kerül, mennyiségtől függően 10-40 percre is akár, amely a levegő eltávolítását az anyagból felgyorsítja. Ezután a keverék az előre elkészített öntőformába kerül,

amely a kialakítandó csatornarendszer negatívja, és az elrendezés 80°C-ra melegített hőkamrába kerül 45 percre, hogy a térhálósodás megvalósuljon.

3.1.6 Bondolás

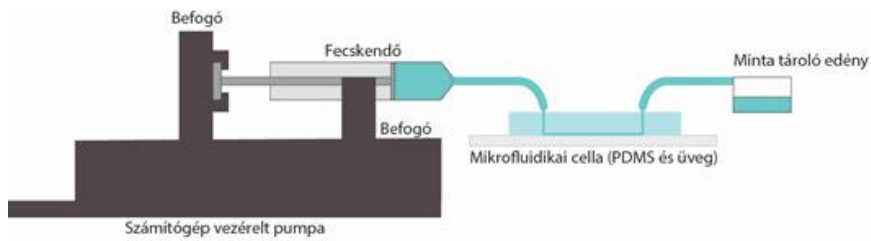
Következő lépésként a csatorna mintájával rendelkező, kitérhálósodott PDMS darab és egy hordozó felület, esetünkben egy másik PDMS lap egymáshoz bondolása következik. Ez által kialakul a zárt mikrofluidikai csatorna (3.9. ábra). Bondolás során koronakisüléssel felületaktiválást alkalmazunk, mely során a koronakisüléssel ionizátor elektródája ionizálja a környezeti levegőt, és helyileg plazmát generál, így a PDMS felületi metil (-CH₃) csoportjai hidroxilcsoportokra (-OH) cserélődnek, majd két Si-OH között Si-O-Si kovalens kötés alakul ki víz kilépés mellett PDMS-PDMS felületek között alakulnak ki. A módszer biztonságos, egyszerűen és gyorsan megvalósítható, és semmilyen speciális környezetre nincs hozzá szükség.



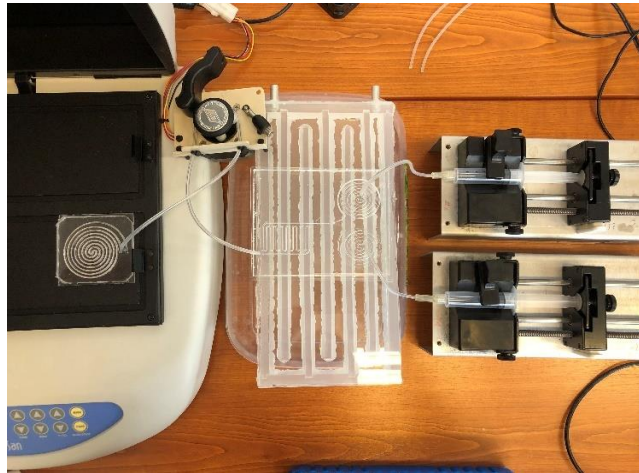
3.9. ábra Kész mikrofluidikai rendszer a bondolás után

Minél frissebben van elkészítve a PDMS, a bondolás annál jobb minőségű lesz, erősebb kötések lehet létrehozni, ezért célszerű öntés után azonnal bondolni is. A bondolni kívánt felületekkel nagy körültekintéssel kell eljárni, nem szabad hozzáérni, ügyelni kell, hogy ne kerüljön a felületekre szennyeződés, ha mégis, azt óvatosan el kell távolítani. Bondolás után az elkészült cellák még fél órára 60°C-os kemencébe kerülnek, a kötések erősítése céljából.

3.1.7 Mérés

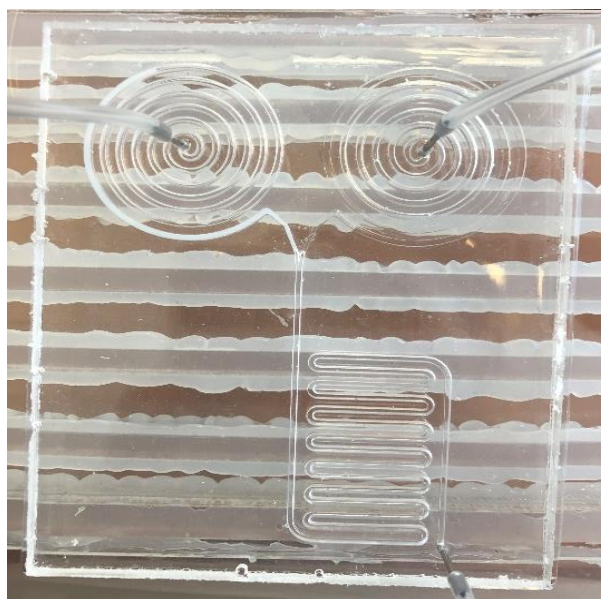


3.10. ábra A mérési elrendezés sematikus illusztrációja



3.11. ábra Mérési elrendezés megvalósítása

A mérési elrendezés a 3.10. ábra és a 3.11. ábra látható. A méréshez való előkészületként a 0,5 ml vérplazma és puffer anyag elegy és a 0,25 ml latex reagens betöltésre kerülnek a tartályként szolgáló spirális csatornarészbe egy-egy fecskendő és szilikoncső segítségével. A fecskendők segítségével a folyadékokat egy szintbe kell hozni, a vizsgálat sikeressége szempontjából ez egy kritikus pont (3.12. ábra).



3.12. ábra A mérés indítása előtti állapot

Ezután a mikrofluidika beömlőnyílásaiba a számítógép vezérelt pumpákba helyezett fecskendő kimeneteit kell helyezni. A léptetőmotor maximális sebessége 2000 RAT. A fecskendő úrtartalmától függően az elkészített karakterizációs mérések alapján ez az érték ml/s-ba átszámítható. Méréseink során 5 ml-es fecskendőt használtunk. A vérplazma puffer elegy oldali fecskendő sebessége 2000 RAT, a latex reagens oldali fecskendőé 700 RAT. Ezekkel a sebességértékekkel elérhető, hogy a két folyadékmennyiség maximálisan keveredjen, a tartály részekből egyszerre fogyjon el. Az összekeveredett minta végigfolyik a csatornarendszeren, majd egy szilikoncső segítségével át kell vezetni a „keringető” részbe, ami egy 37°C-os hot platen van elhelyezve. Ha az egész folyadékmennyiség átkerül a keringetőbe, zárni a kell a kört a szilikoncsővel és elindítani a perisztaltikus pumpát, ami két percen keresztül inkubálja a mintát. A két perc leteltével a rendszerben keringő mintát szintén a szilikoncső segítségével egy kis üvegcsébe kell kivezetni, ami aztán az ACL-500 koagulációs automatába kerül vizsgálatra.

3.2 Szimulációs módszerek

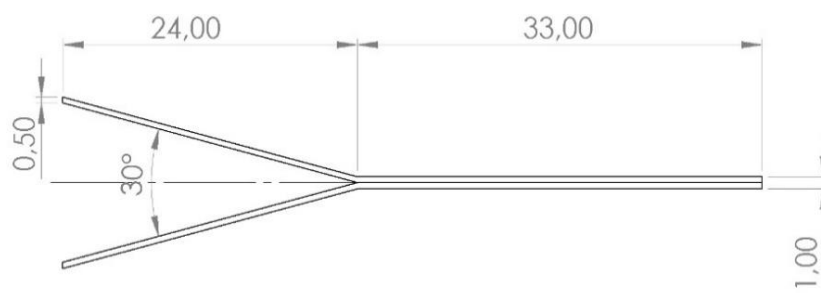
A mikrofluidikai cella geometriájának megtervezése a Illustrator nevű CAD program segítségével történt. Az így megtervezett csatorna egyszerűen átimportálható a *Comsol Multiphysics 3.5* szimulációs programba. A szimulációk elvégzéséhez többféle geometriai terv készült.

3.2.1 Y-alapú geometriai tervek

Az első, Y-alapú mikrofluidikai csatorna két bemeneti porttal rendelkezik, amelyek egy kimeneteli csatornává alakulnak. A csatornában kialakuló nyírófeszültség modellezése először egy kétdimenziós, majd egy háromdimenziós CAD modell által valósult meg.

3.2.1.1 A kétdimenziós csatorna

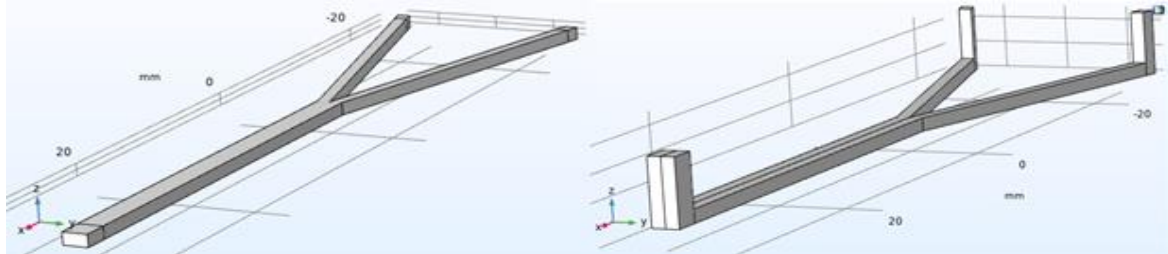
A kétdimenziós geometria bemeneti ágai 0,5 mm szélesek, amelyek találkozása 1 mm széles kimeneti ágat eredményez. A pontos, mm-ben megadott geometriai terv az alábbi ábrán látható (3.13. ábra):



3.13. ábra A kétdimenziós modell geometriája

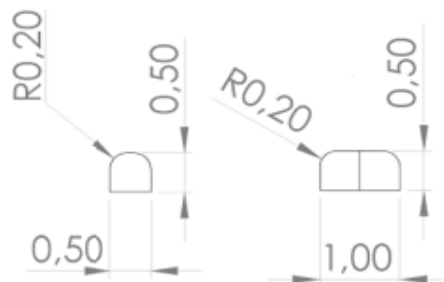
3.2.1.2 A háromdimenziós csatorna

A háromdimenziós csatorna ugyanazokkal az alap méretekkel rendelkezik x-y irányban, mint a kétdimenziós modell. A 3.14. ábra szemlélteti a kezdeti terveket. Itt még más keresztmetszeti értékek voltak alkalmazva, mint a végleges verzióban.

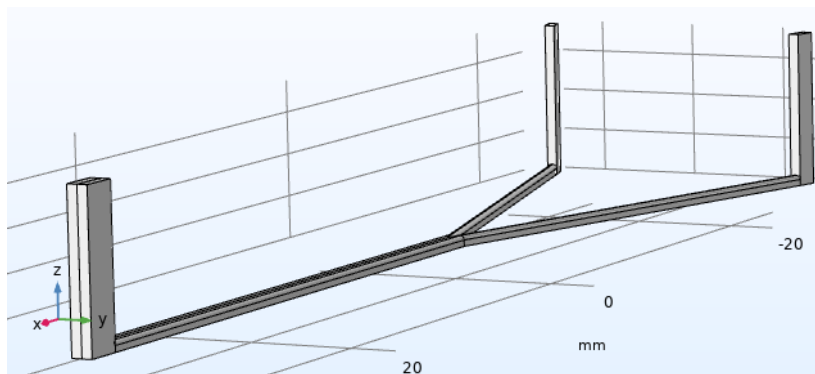


3.14. ábra A kezdetleges, első (balra) és második (jobbra) geometria tervek

Az első geometriai terv csak a csatornarendszert modellezte. Az ezután tervezett geometriai megoldások a valóságban végrehajtott kísérletekhez használt mikrofluidikai rendszert vették alapul, és a bemeneti és kimeneti portok is pontosabban meg lettek határozva, emellett a két folyadék találkozásánál lévő csatornaszakasz ketté lett választva, aminek segítségével pontosan megadhatóak lettek az adott folyadék fázisokhoz tartozó térfogatok. Emellett a csatornarendszer szélének lekerekítése is megvalósult. A szimulációkhoz használt végleges tervet a 3.16. ábra, míg a végleges keresztmetszeti kialakítást a 3.15. ábra mutatja be. A kialakítás célja, egy olyan mikrofluidikai cella létrehozása, amely az artéria modellezésére, illetve két különböző folyadékminta összeengedésére képes.



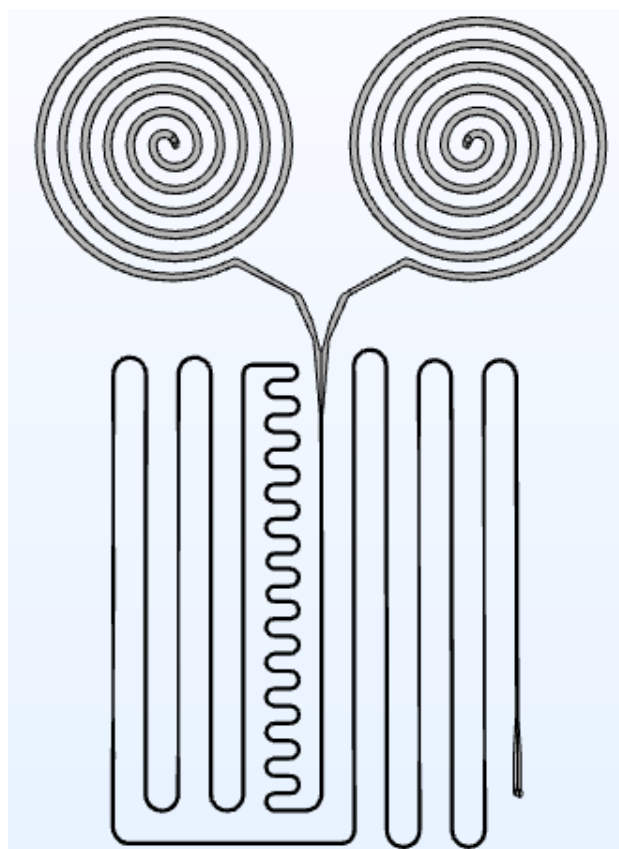
3.15. ábra Az Y-alapú háromdimenziós csatorna keresztmetszeti képe



3.16. ábra A Y-alapú csatorna végleges geometriája

3.2.2 A második geometriai terv

Az új csatornaelrendezés elsődleges célja az, hogy a két folyadékot egyszerre lehessen elindítani. Ennek érdekében egy tároló szakaszba kell betölteni őket, azonban az előzetesen alkalmazott tároló nagy mérete buborékokat eredményezett. A kis keresztmetszetű csatornával kiküszöbölhető a reagens falra való felfutása és a buborékképződés. Azt, hogy a kis keresztmetszet mellett nagy térfogatot tárolására legyen alkalmas, spirál alakú elrendezés biztosította. Majd a folyadékok összefolyása után egy keverős szakasz került beépítésre, illetve az egyenes szakaszokon a csatorna bal oldalán egy hosszabb, és két rövidebb szakaszon szűkebb keresztmetszetű régiók segítik az áramlási sebesség növelését, míg a csatorna jobb oldalán két hosszabb szakaszon történik ez (3.17. ábra).



3.17. ábra Az új geometriai elrendezés

3.2.3 A szimuláció részletezése

A geometria pontos megtervezése, a peremfeltételek és paraméterek megadása után történik a hálózás, majd az eredmények kiszámítása.

Két, egymással nem elegyedő folyadék közötti interfész esetén, mind a két-, mind a háromdimenziós modell esetén a Multiphase flow □ Two-phase flow, Phase field □ Laminar flow beállítás került kiválasztásra. Annak érdekében, hogy a valóságot leginkább tükröző körülményeket a szimuláció során megteremtsem, a következő peremfeltételeket adtam meg:

- Lamináris áramlás alacsony Reynolds-szám mellett
- Newtoni folyadék
- Csúszásmentes (no-slip) határfeltétel
- Összenyomhatatlan folyadék

A folyadékok áramlásának leírására a már korábban ismertetett Navier-Stokes egyenletet alkalmazta a program (2-4).

A kétdimenziós modell esetén a nyírófeszültség az alábbi módon került kiszámításra:

$$\tau = \eta \cdot \mu \quad (5)$$

ahol τ (Pa) a nyírófeszültség, μ (1/s) a nyírási sebesség, és η (Pa·s) a dinamikai viszkozitás.

A háromdimenziós modellek esetén a nyírófeszültség kiszámításához a program által számolt nyírási sebességet szoroztam be a két folyadékra jellemző dinamikai viszkozitás, valamint a térfogattört (Φ) szorzatával.

$$\tau = \gamma * (\Phi_2 * \mu_2 + \Phi_1 * \mu_1) \quad (6)$$

A Comsol programba a következőképpen került be az egyenlet:

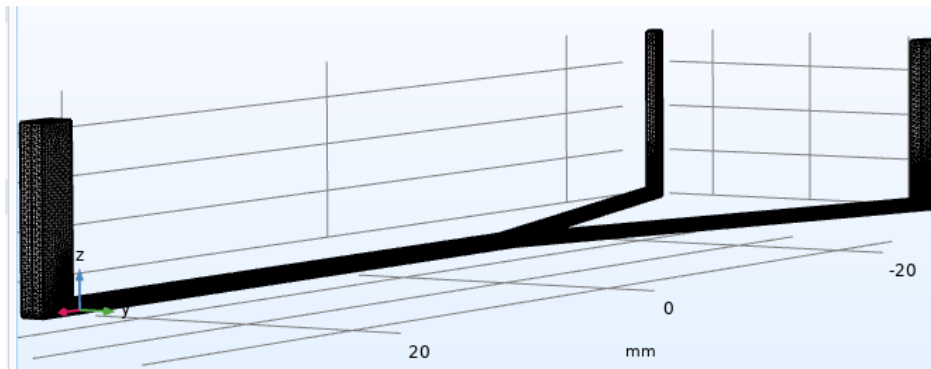
$$\tau = spf. sr * (pf. Vf2 * 0.00105 + pf. Vf1 * 0.0058) \quad (7)$$

Emellett 293,15 K konstans hőmérséklet került beállításra a csatorna egészén. Az egyik bemeneten a vizsgálatok szerint a vérplazma minta és puffer oldat keveréke, a másikon pedig az alkalmazott latex reagens beáramoltatása történik. Szimulációs szempontból ezekre az anyagokra egyszerűsítést alkalmaztam, amely szerint a vérplazma és puffer oldat keveréket vérplazmaként, míg a latex reagenst vízként modelleztem a szimulációk során. Ezen anyagok jellemző dinamikai viszkozitás és sűrűség értékei (2. Táblázat) jól közelítik a tesztelések alatt alkalmazott anyagokéit.

2. Táblázat A víz és a vérplazma dinamikai viszkozitása és sűrűsége [54]

Anyag	Dinamikai viszkozitás ($mPa \cdot s$)	Sűrűség (kg/m^3)
Víz	1.05	997
Vérplazma	5,8	1025

A bemeneti és kimeneti portok pontos beállítása után a különböző folyadékok csatornaszakaszokhoz való megadása következik. A folyadékok bemenetére vonatkozóan $0,3 m/s$ áramlási sebességet adtam meg, amely az artériákban jellemző átlagos áramlási sebességnek felel meg; a kimeneten a megadott nyomásérték $0 Pa$. A szimuláció végeleemes háló beállításra az Y-alapú csatorna kétdimenziós modellje esetén finom háromszöges háló került megadásra, amely 7206 elemből áll; a háromdimenziós modellnél egy finomabb tetraéderes háló lett beállítva, amely 1419947 elemet tartalmaz (3.18. ábra). A második geometria esetén is finomabb tetraéderes hálót alkalmaztunk, amely 993865 elemből áll.



3.18. ábra Az Y-alapú 3D modell végeleemes hálója (mesh)

4 Kísérleti és szimulációs eredmények

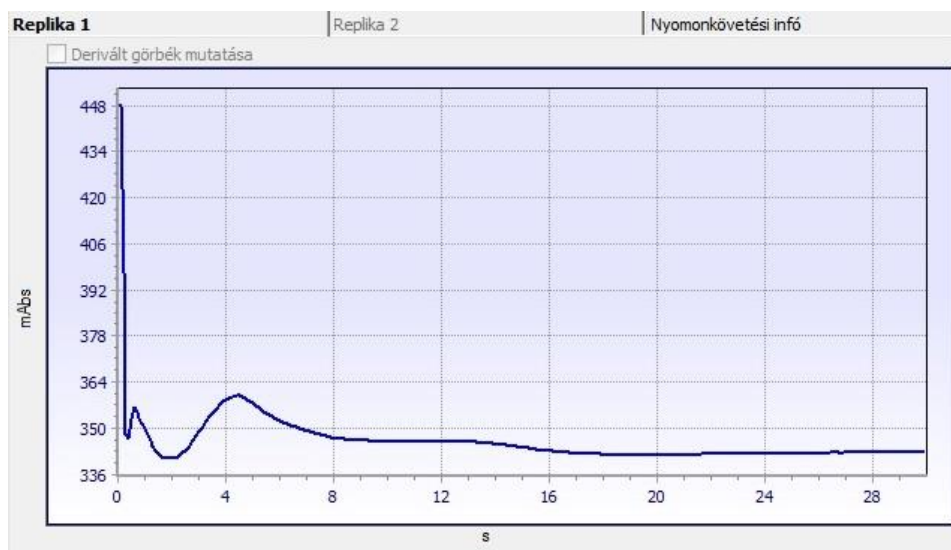
Ebben a fejezetben kerülnek bemutatásra a nyomtatott öntőforma segítségével elkészített mikrofluidikai csatornákkal végzett kísérletek eredményei. Ezután a számítógépes szimuláció által kapott eredményeket szemléltetem.

4.1 Kísérleti eredmények

A kísérleteket a Semmelweis Egyetem Belgyógyászati és Hematológiai Klinikán végeztük Dr. Szederjesi Attila és Dr. Horváth Róbert közreműködésével.

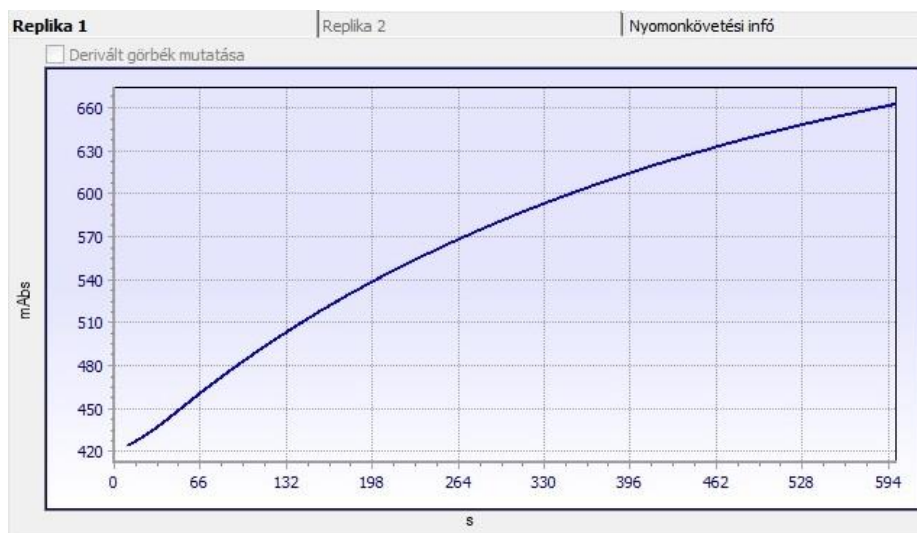
4.1.1 Az Y-csatornával végzett kísérlet

A mérés során ACL-500 koagulációs automatával vizsgáltuk a pre-aktivált és aktivált mintákat vWF:GPIbR tesztben. A mérés elve szerint a végső, százalékos vWF:GPIbR eredmény megadásához két mérés szükséges; egy aktiváció előtti, és egy aktiváció utáni abszorbancia eredmény. Kontroll mérésként risztocetinnel történő aktivációt alkalmaztunk. Aktiváció előtti, normál plazmás fotometrált mérés eredménye a két mérés során $317 \Delta mAbs$ (4.1. ábra) és $342 \Delta mAbs$ volt.



4.1. ábra ACL-500 automata fotometrált $mAbs$ eredménye, aktiváció előtt normál plazmával

A következő kísérlet során a vWF:GPIbR tesztbe belepipettáztuk az aktiváló risztocetin ágenszt is, és ezután $662 \Delta mAbs$ értéket kaptunk (4.2. ábra).



4.2. ábra ACL-500 automata fotometrálta $mAbs$ eredménye risztocetin aktiváció után, normál plazmával

Harmadik lépésként a mikrofluidikai cella által aktivált minta visszamérése történt. A kísérlet során a RealTerm program segítségével 2 db New Era NE-500 típusú fecskendő pumpa irányításával történt a folyadékok csatornába való áramoltatása. A beállítás során 0,23 m/s -os bemeneti áramlási sebességet hoztunk létre. A csatorna egyik szárában áramlott a minta és a puffer elegy, míg a másikon latex reagenst áramoltattunk, ezután megmértük a mintát, mely 680 $\Delta mAbs$ értéket mutatott. Ez az érték megközelíti a risztocetinnel aktivált minta eredményét. Második mérésünk során 497 $\Delta mAbs$ értéket kaptunk, mely szintén magasabb az aktiválatlan minta esetén kapott eredménynél. A kapott eredményeket az 3. táblázatban foglaltam össze. Összességében elmondható, hogy az eredeti protokollnak megfelelő eljárással kapott abszorbancia eredmények hasonlóak a cellában kapott, nagy nyíróerő hatására aktivált minták eredményeihez.

3. Táblázat Mérési eredmények összegzése

Aktiváció előtt ($\Delta mAbs$)	Risztocetinnel aktivált ($\Delta mAbs$)	Mikrofluidikai cellában aktivált ($\Delta mAbs$)
317	662	680
342		497

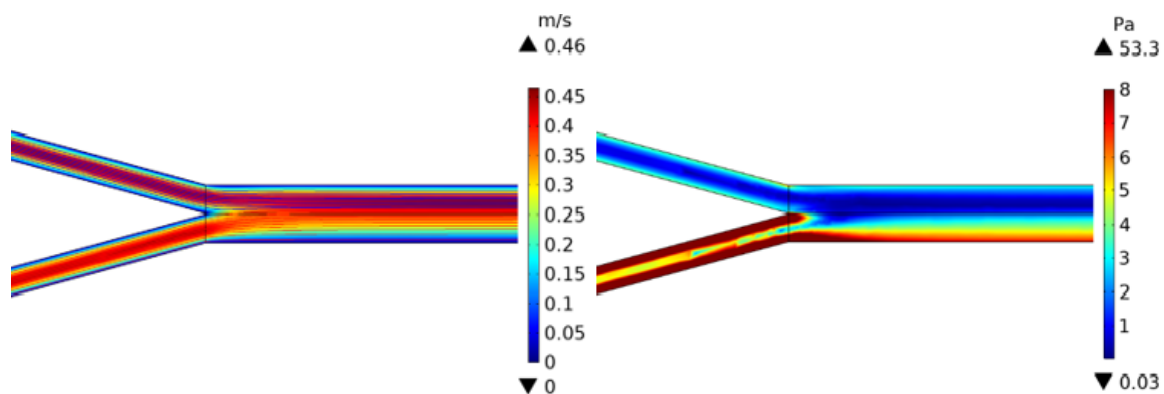
4.2 Szimulációs eredmények

A következőkben bemutatásra kerül a folyadékok áramlási sebességprofilja, valamint a nyírófeszültség alakulása. Ezek viszonylag könnyen kiszámíthatóak a szimulációs program beépített algoritmusainak köszönhetően.

4.2.1 Az Y-alapú kétdimenziós modell

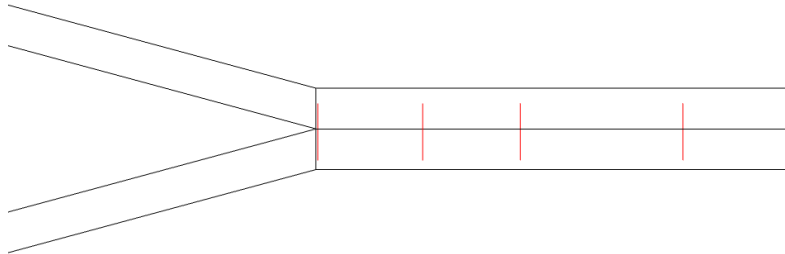
A szimuláció célja a csatornában kialakuló áramlási sebesség, a folyadékok áramvonalai, és a nyírófeszültség meghatározása.

A csúszásmentes peremfeltétel miatt a csőfal mellett az áramlási sebesség értéke 0 m/s , míg a maximális sebesség a csatorna közepén található. $0,3 \text{ m/s}$ bemeneti sebesség (víz esetén u_{v0} , vérplazma esetén u_{p0} jelöléssel) mellett a maximális sebesség $0,46 \text{ m/s}$ lett. A két folyadék összefolyása után a sebességprofil eltolódik a felső, vizet tartalmazó ág felé. Emellett megfigyelhető még, hogy a vérplazma áramlásának áramvonalai a középvonalat keresztezve haladnak. Ezek a jelenségek a két anyag különböző viszkozitás és sűrűségbeli tulajdonságai miatt következnek be (4.3. ábra, bal). A sebességprofilhoz tartozó nyírófeszültség értékek az ábra jobb oldalán láthatók, ahol a maximális érték ($53,3 \text{ Pa}$) a cső falán, a vérplazma bemeneti csatornájában mérhető.



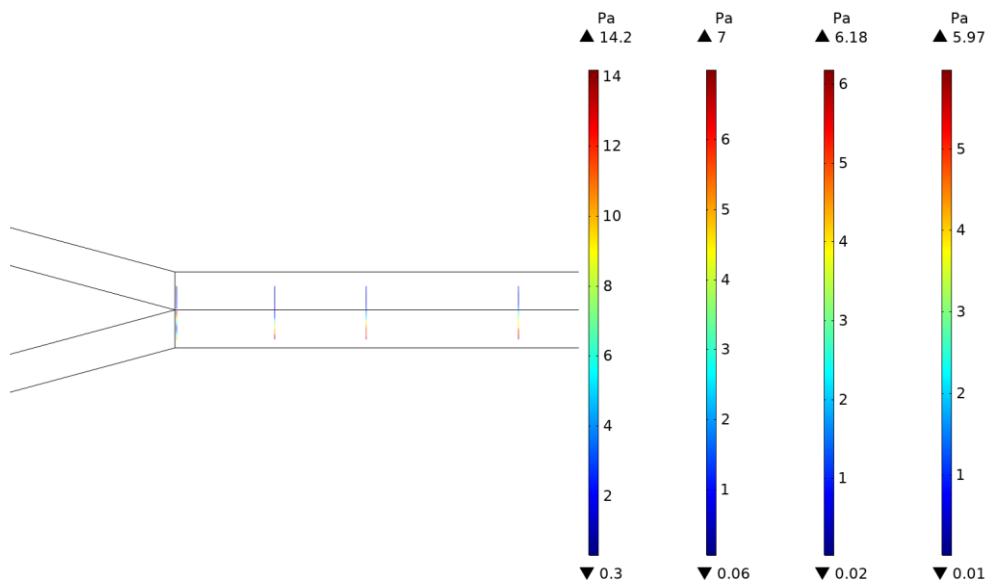
4.3. ábra Áramlási sebesség (balra) ($u_{v0} = u_{p0} = 0,3 \text{ m/s}$) és nyírófeszültség (jobbra) a kétdimenziós modellben

A két folyadék határán fellépő maximális nyírófeszültség meghatározását nehezíti, hogy a legmagasabb nyírófeszültség értékek mindig a modell falánál lesz mérhető (ez a csúszásmentes határfeltétel miatt következik be), így a kapott maximális nyírófeszültség érték nem ad megfelelő információt a csatorna belsejében fellépő feszültség értékekről. Emiatt a csatorna összefolyása után négy metszeti profilt határoztam meg a csatorna mentén (4.4. ábra).



4.4. ábra A metszeti profilok elhelyezkedése (0.1 mm; 1.3 mm; 2.5 mm; 4.5 mm távolságra a kereszteződéstől)

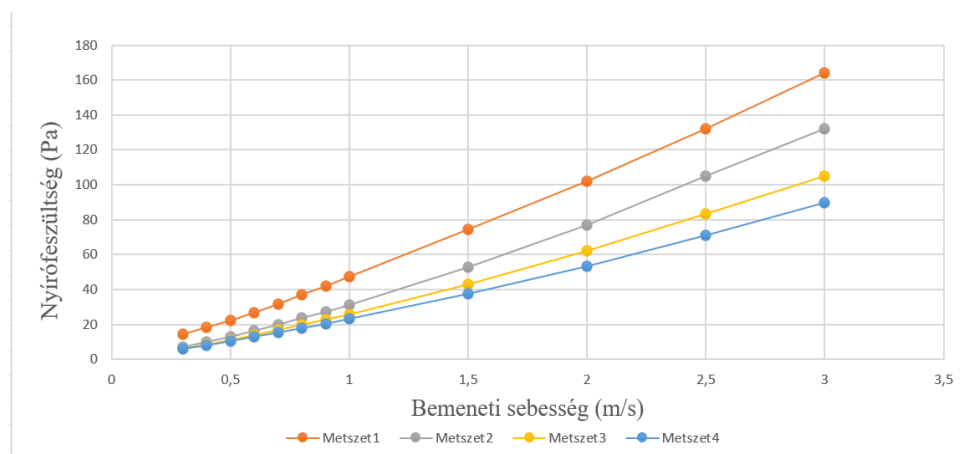
A 4.4. ábra által mutatott metszeti profilok mentén kapott nyírófeszültség értékeket sorrendben a 4.5. ábra ábrázolja.



4.5. ábra A négy metszeti profil mentén kialakuló nyírófeszültség ($u_{v0} = u_{p0} = 0.3 \text{ m/s}$)

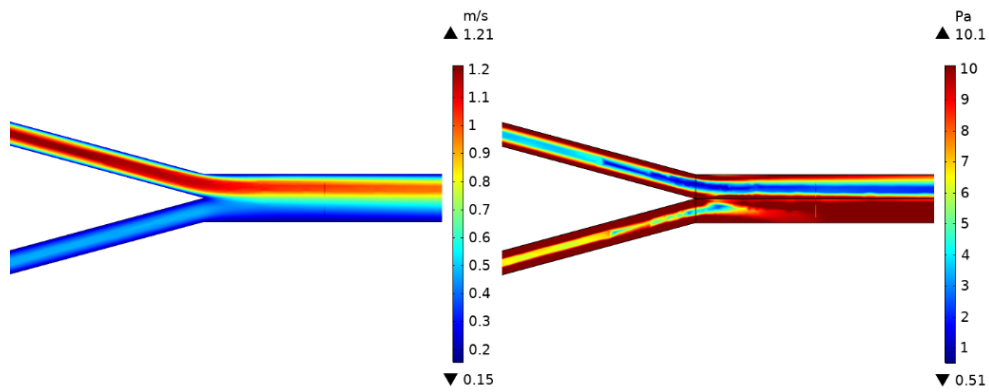
A metszeti vonalak által kapott értékek kisebb maximális nyírófeszültséget érnek el, mint az egész csatorna mentén, ugyanis a vonalak elhelyezéséből adódóan sikerült kiküszöbölni a fal melletti magas nyírófeszültségek hatását. Ahogy az ábrán is látható, az első és második metszeti profil esetén a két csatorna összefolyása miatt még nem alakult ki a végleges sebesség profil, ezért itt a nyírófeszültség értékek magasabbak. A harmadik, és negyedik metszeti profil viszont már megfelelően jellemzi a folyadékok között fellépő nyírást. 0,3 m/s bemeneti sebességnél a két folyadék között fellépő legnagyobb nyírófeszültség a modell alapján 6 Pa körüli értékre esik. Az artériás érrendszerre jellemző nyírófeszültség 1-7 Pa között mozog [55], ami jól közelíti az általunk kapott eredményt.

Különböző, magasabb bemeneti sebességek mellett megvizsgáltam a metszeten kapott maximális nyírófeszültséget (4.6. ábra), ahol $u_{v0} = u_{p0}$. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a sebesség növelése lineárisan növeli a maximális nyírófeszültséget a csatorna egészében és a folyadékok között is.

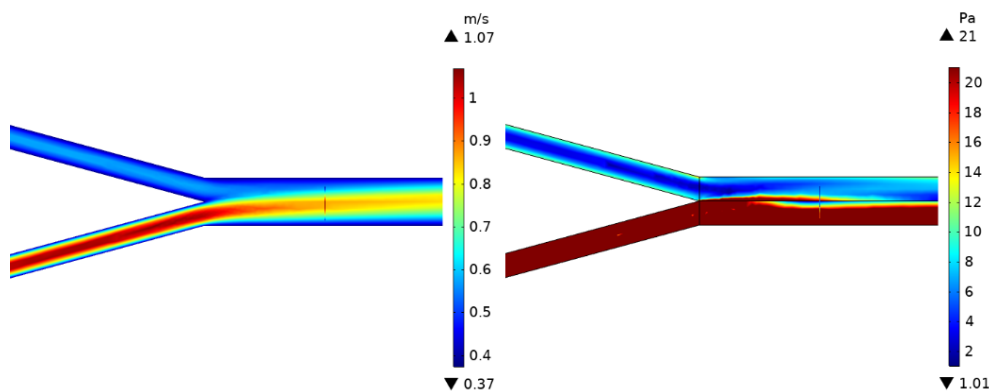


4.6. ábra A metszetekkel kapott maximális nyírófeszültség értékek különböző bemeneti sebesség mellett ($u_{v0} = u_{p0}$)

A két bemeneti csatornában eltérő sebességeket alkalmazva változást tapasztalunk a metszeti profilokon is. A harmadik metszeten vizsgáltam a létrejövő változásokat. A víz bemeneti sebességét növelve 10.1 Pa nyírófeszültséget kaptam (4.7. ábra), ami kisebb, mint mindkét bemeneti sebességet megnövelve (25.7 Pa, 4.8. ábra). A vérplazma bemeneti sebességének növelése 21 Pa maximum értéket hoz a keresztmetszeti profilon.



4.7. ábra Áramlási sebesség (balra) és nyírófeszültség (jobbra) eltérő bemeneti sebesség esetén ($u_{v0} = 1 \text{ m/s}$; $u_{p0} = 0.3 \text{ m/s}$)



4.8. ábra Áramlási sebesség (balra) és nyírófeszültség (jobbra) eltérő bemeneti sebesség esetén ($u_{v0} = 0.3 \text{ m/s}$; $u_{p0} = 1 \text{ m/s}$)

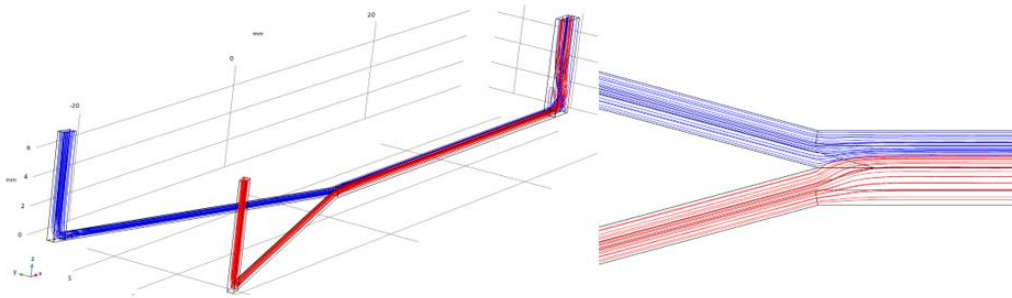
Az áramvonalak attól függően tágulnak, hogy melyik folyadék bemeneti sebességét növeljük.

4.2.2 Az Y-alapú háromdimenziós modell

A következőkben a folyadékok áramlási sebességprofilját, a nyomást, a folyadékok határán fellépő interakciót, valamint a nyírófeszültség alakulását fogom bemutatni a háromdimenziós modell esetén.

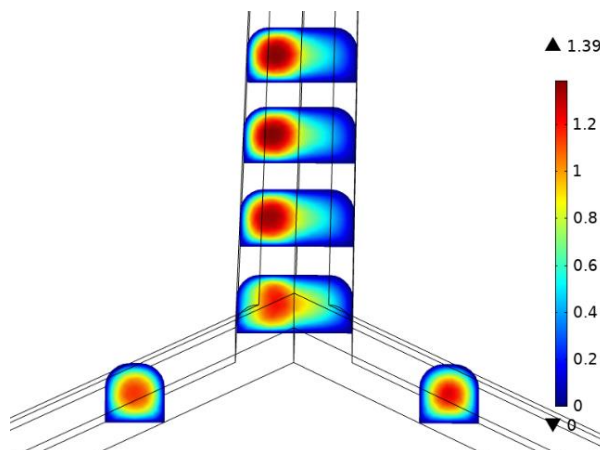
4.2.2.1 Áramlási sebesség

Először a két folyadékra jellemző áramlási vonalak ábrázolása valósult meg (4.9. ábra), melynek segítségével illusztrálható az áramlás csatornában való alakulása. Látható, hogy a két bemeneti csatornaszakasz összefolyásánál a kétdimenziós modelleknél is jellemző áramvonal eltolódás történt.



4.9. ábra Áramvonalak a csatornában ($u_{v0} = u_{p0} = 0,3 \text{ m/s}$); kék – víz, piros – vérplazma

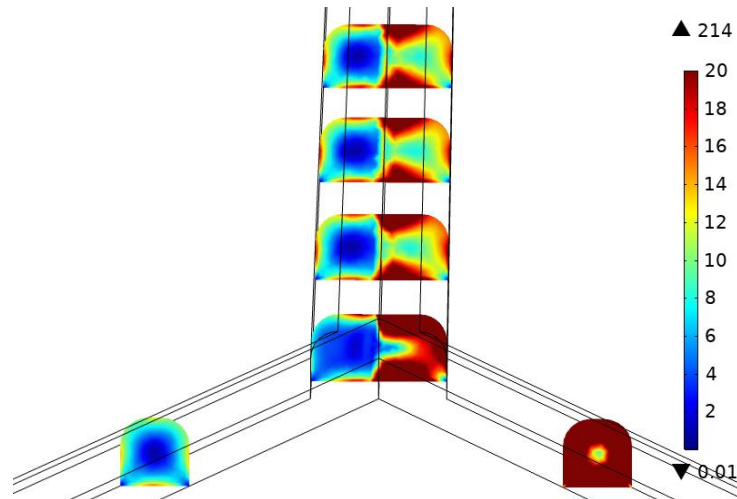
A szimulációs program beépített algoritmusának segítségével számoltattam ki az áramlási sebesség értékeket (m/s), melyeket a 4.10. ábra mutat be. A skála segítségével leolvashatjuk, hogy a legmagasabb kapott érték $1,39 \text{ m/s}$. Ez az érték jelentősen magasabb, mint a kétdimenziós tanulmány esetében. Jól látható, hogy a csatorna falához közeli kék színnel jelölt áramlási sebessége 0 m/s , a csatorna belseje felé egyre nő az áramlás, majd a két folyadék találkozásakor a vérplazma magasabb sűrűségértéke miatt a víz oldalára tolódik az áramlási sebesség maximum (ez megfelel a kétdimenziós modell eredményének is). Az áramlási sebesség középértéke $0,7 \text{ m/s}$ értéket mutat.



4.10. ábra A csatornában kialakuló áramlási sebességprofil ($u_{v0} = u_{p0} = 0,3 \text{ m/s}$)

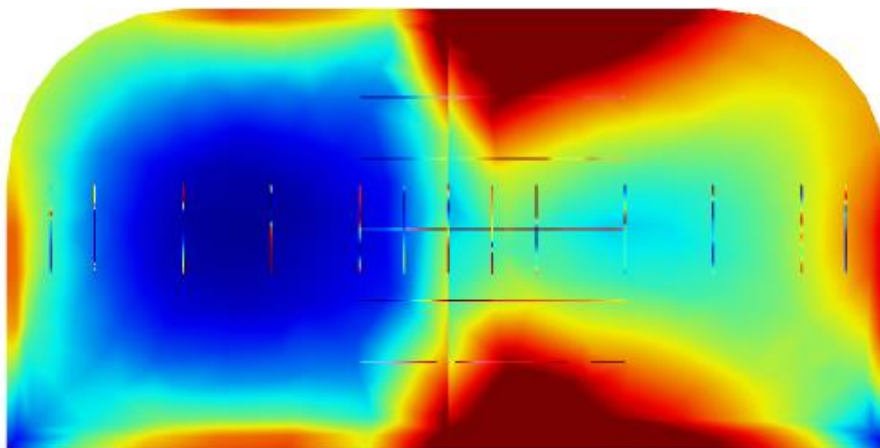
4.2.2.2 Nyírófeszültség

A nyírófeszültség értékekre kapott eredményeket a 4.11. ábra mutatja be. Ahogyan azt a kétdimenziós szimulációknál is látható, a legmagasabb nyírófeszültség értékek a fal mentén alakulnak ki. Az ábrán látható maximum érték (214 Pa) ráadásul a vérplazmához tartozó bemeneti csatornánál jelenik meg. Átlagosan 8 és 12 Pa között változtak az értékek, ami magasabb lett a várt értéknél, azonban az áramlási sebesség növekedése miatt reálisnak tekinthető.



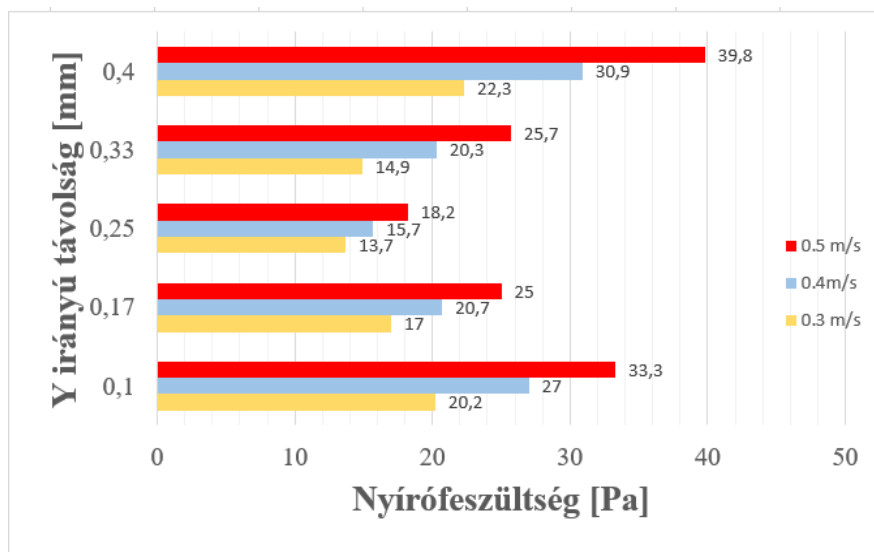
4.11. ábra A csatornában kialakuló nyírófeszültség ($u_{v0} = u_{p0} = 0.3 \text{ m/s}$)

Itt is megállapítható tehát, hogy ahhoz, hogy reális eredményeket kapjunk két folyadék közötti fellépő nyírófeszültség értékről érdemes keresztmetszeti profilokon önkényesen meghatározott vonal metszeteket generálni és ezeken a metszeteken megállapított nyírófeszültség értékekből számolni egy átlagos értéket. A két folyadék találkozásánál kijelöltem 5 db párhuzamos keresztmetszetet, valamint a csatorna két oldala között 13 db merőleges keresztmetszeti profilt, amelyeket a 4.12. ábra szemléltet.



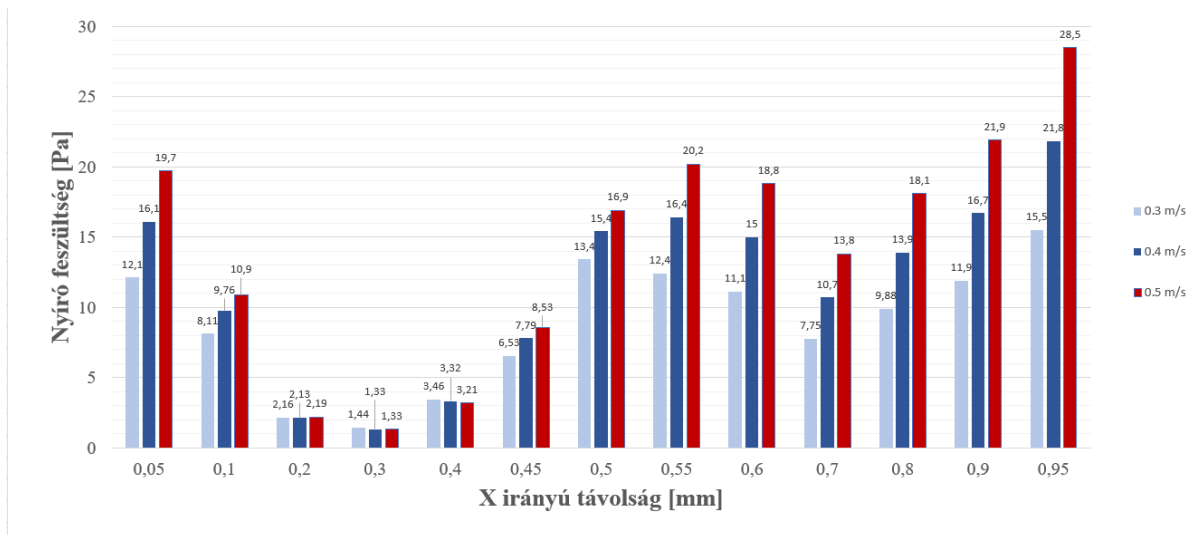
4.12. ábra Keresztmetszeti profilok a háromdimenziós modellben

A metszetek vizsgálatához $u_{v0} = u_{p0} = 0.3 \text{ m/s}$, majd $u_{v0} = u_{p0} = 0.4 \text{ m/s}$, végül $u_{v0} = u_{p0} = 0.5 \text{ m/s}$ bemeneti sebességeket használtam. A párhuzamos metszetekből kapott értékeken is látható, hogy a csatorna falához közeli alsó és felső metszetekhez magasabb nyírófeszültség tartozik (20,2-39,8 Pa) amelyek nem jellemzik kellően a két folyadék határán fellépő nyírófeszültséget. A középső három metszeten megfigyelhető a folyadékok közötti nyírófeszültség (13,7 és 25,7 Pa között). A diagram Y-tengelyén a keresztmetszetek csatorna falától való távolságát adtam meg, míg az X-tengely a kapott nyírófeszültséget ábrázolja (4.13. ábra).



4.13. ábra A párhuzamos keresztmetszeti profilok maximális nyírófeszültsége

A merőleges keresztmetszeti profilokon is egyértelmű eltérés látható a csatorna fala mellett mért és a csatorna közepén lévő értékek között. A csatorna falához közel mindhárom sebességen nagyobb a nyírófeszültség, mint a csatorna közepéhez közelítve. A két folyadék határa a $0,3 \text{ m/s}$ sebességnél $0,5 \text{ mm}$ -nél, míg a $0,4$ és $0,5 \text{ m/s}$ sebességnél $0,55 \text{ mm}$ -nél állapítható meg. A három sebességre nézve $13,4$; $16,4$ és $20,2 \text{ Pa}$ közötti maximális nyírófeszültség értékek jelentek meg a két folyadék fázis között (4.14. ábra). A diagram X-tengelyén a vizet tartalmazó csatornaág falától számított távolságot ábrázoltam, az Y-tengelyen pedig a keresztmetszeteken kialakuló maximális nyírófeszültséget.



4.14. ábra A merőleges keresztmetszeti profilok maximális nyírófeszültsége (bal oldal víz; jobb oldal vérplazma)

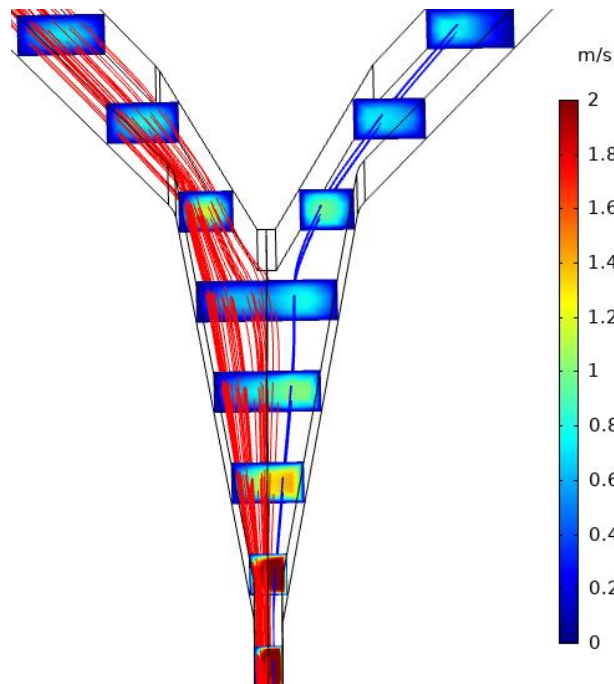
A kapott értékek alapján itt is megfigyelhető, hogy a bemeneti sebesség növelése lineárisan növeli a maximális nyírófeszültség értékét a csatorna falához közel, és a két folyadék között is. Megállapítható az is, hogy míg a víz oldalán ez a növekedés 3-4 Pa közötti lépésekben halad, addig a plazma oldalán 6 Pa-al emelkedik.

4.2.3 Az új csatorna modellje

Ez a rész a folyadékok áramlási sebességprofilját és a nyírófeszültség alakulását mutatja be a folyadékok összefolyásánál, valamint a szűkebb keresztmetszeteknél.

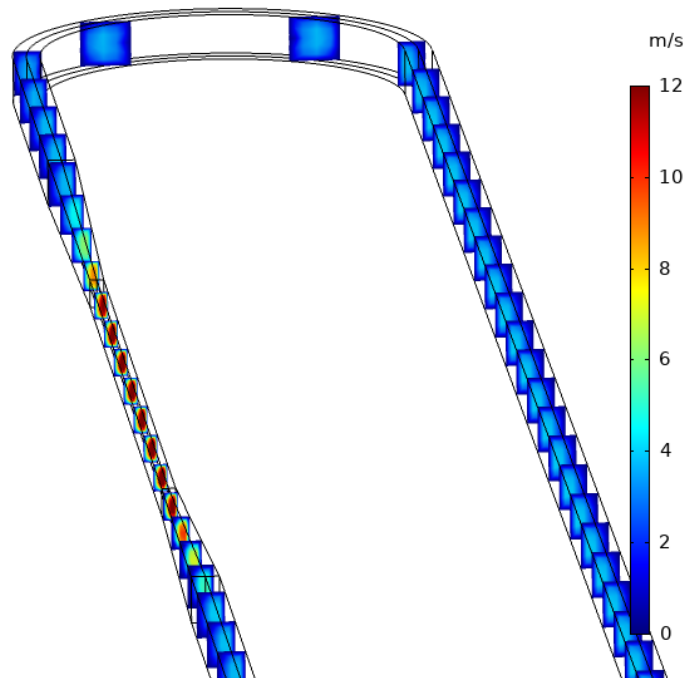
4.2.3.1 Áramlási sebesség

Az alábbi ábrán látható a két folyadék összeáramoltatásakor kialakuló áramlási sebességprofil. Az előző szimulációkhoz hasonlóan itt is megfigyelhető, hogy a csatorna fala mentén kék színnel megjelenő áramlási sebességérték 0 m/s, a csatorna belsejében pedig nő a sebesség. A két folyadék találkozásakor a nagyobb sűrűséggel rendelkező vérplazma a víz oldalára tolja az áramlás maximumát. Az áramlási sebesség a szűkített keresztmetszetnél 2 m/s-t mutat (4.15. ábra). Megfigyelhető az is, hogy az ábrán késsel jelölt víz áramlása elmarad a vérplazma áramlási sebességétől, emiatt a vérplazma gyakorlatilag eldugítja a csatornát és a két folyadék egymás mellett való áramlása nem valósul meg. Ezzel a geometriai tervvel végzett kísérlet is ezt mutatta. További szimulációkkal vizsgálható, hogy az összefolyási szakasz növelésével a probléma kiküszöbölhető-e.



4.15. ábra A csatornában kialakuló áramlási sebességprofil ($u_{v0} = u_{p0} = 0.3 \text{ m/s}$)

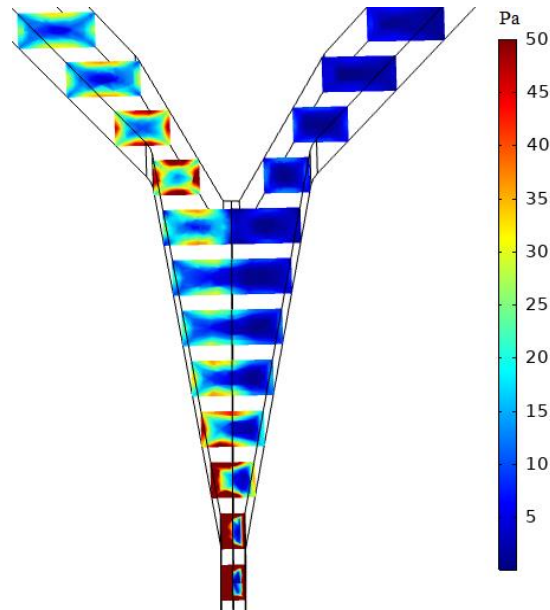
A csatorna keringető utáni legszélső ágában alkalmazott szűkített keresztmetszetben kialakult áramlási sebességet a következő ábra szemlélteti. Jól látható, hogy a szűkebb keresztmetszet hatására az előtte 2 m/s átlagsebesség 12 m/s -ra növekedett.



4.16. ábra A szűkített keresztmetszetben kialakuló áramlási sebesség ($u_{v0} = u_{p0} = 0.3 \text{ m/s}$)

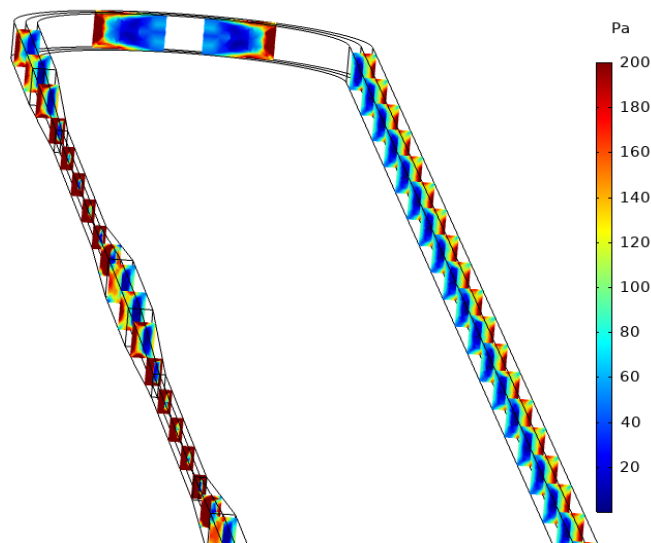
4.2.3.2 Nyírófeszültség

A nyírófeszültség értékekre kapott eredményeket a 4.17. ábra mutatja be. Ahogyan az előző szimulációknál is látható, a legmagasabb nyírófeszültség értékek a fal mentén alakulnak ki. Az ábrán látható maximum érték (50 Pa) a vérplazmához tartozó bemeneti csatornánál jelenik meg. A szűkebb keresztmetszetnél a folyadékok határán 30 Pa körüli nyírófeszültség van.



4.17. ábra A csatornában kialakuló nyírófeszültség ($u_{v0} = u_{p0} = 0.3 \text{ m/s}$)

A csatorna keringető utáni legszélső ágában alkalmazott szűkített keresztmetszetben kialakult nyírófeszültséget a következő ábra szemlélteti (4.18. ábra). A szűkebb keresztmetszetek esetén jelentős nyírófeszültség érték növekedést láthatunk.



4.18. ábra A szűkített keresztmetszetben kialakuló nyírófeszültség ($u_{v0} = u_{p0} = 0.3 \text{ m/s}$)

5 Összefoglalás

TDK dolgozatunk keretein belül a von Willebrand faktor aktivitását vizsgáltuk különböző áramlási paraméterekkel rendelkező mikrofluidikai rendszerekben

Kutatómunkánk során a szakirodalom tanulmányozásával bővítettük ismereteinket, átfogó képet kaptunk a von Willebrand faktor működéséről, véralvadásban betöltött szerepéről. Megismertük a munkánkhoz szükséges szoftvereket: a *Comsol Multiphysics 3.5* végeselem szoftvert a szimulációkhoz és az *Autodesk Inventor CAD* szoftvert a 3D nyomtatott öntőformák megtervezéséhez. A faktor aktivitásának áramlási körülményeit egy funkcionális mikrofluidikai rendszer segítségével vizsgáltuk. A mikrofluidikai csatornában fellépő nyírófeszültség meghatározását a modellező környezetben végrehajtott szimulációk tették lehetővé.

Az áramlási sebesség és nyírófeszültség meghatározása a modellen futtatott szimulációk segítségével történt, ezek alapján megállapítható, hogy az áramlási sebesség és a nyírófeszültség között lineáris kapcsolat van. Ezzel párhuzamosan a szimulációs és korábbi mérési eredmények alapján a mikrofluidikai rendszer csatornageometriáját is frissítettük, mérésekkel teszteltük.

A kísérlet elvégzéséhez 3D nyomtatott öntőforma segítségével hoztunk létre a mikrofluidikai cellát, majd összehasonlítottuk a cella által aktivált, és risztocetinnel aktivált von Willebrand faktor aktivitását.

6 Feladatmegosztás

A kutatáshoz kapcsolódó feladatok tartalmaztak közös és egyéni részeket. A faktor vizsgálatához gyártott mikrofluidikai rendszerek öntőformájának 3D tervezése, PDMS-el való öntése, és hordozóhoz bondolásával és a mikrofluidikai cella tesztelésével Kamondi Noémi foglalkozott. A mikrofluidikai csatornarendszerben létrejövő nyíróerő, és áramlási viszonyok vizsgálatára irányuló számítógépes szimulációk elvégzését Kovács Rebeka végezte. Emellett a csatorna optimalizálása a multifizikai modellezés és a laboratóriumi mérések által valósult meg. A mikrofluidikai csatornával végzett méréseket közösen hajtottuk végre, valamint a munkánk folyamán végig segítettük egymás kutatásait.

7 Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönjük Borók Alexandrának a rengeteg szakmai tanácsot és iránymutatást, amellyel a dolgozat megírását segítette. Köszönjük, a modellek tervezésében és a szimulációk megalkotásában nyújtott segítségét, valamint, hogy kérdéseink esetén mindig rendelkezésre állt.

Nagyon szeretnénk megköszönni témavezetőnknek, Dr. Bonyár Attilának, hogy számunkra inspiráló, és érdekes témában végezhetjük kutatásunkat, és tanácsaival segítette munkánkat.

Köszönjük szépen a Semmelweis Egyetem Belgyógyászati és Hematológiai Klinika munkatársainak, Dr. Bodó Imrének, Dr. Szederjesi Attilának és Horváth Róbertnek, a kísérlet elvégzésében nyújtott segítségüket.

Köszönet illeti még az EFI laboratórium munkatársait, akik a laborban töltött napok során mindig gondoskodtak a jókedvünkről.

8 Irodalomjegyzék

- 1 Nichols W. L., Hultin M. B., James A. H., Manco-Johnson M. J., Montgomery R. R., Ortel T. L., Rick M. E., Sadler J. E., Weinstein M., Yawn B. P., von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008; 14: 171-232.
- 2 Koutts J. (2006) A short history of diagnostic tests for von Willebrand disease: in memory of Barry Firkin (1930 to 2001) and Ted Zimmerman (1937 to 1988). *Semin Thromb Hemost*, 32: 445-455.
- 3 Fonyó Attila Az orvosi élettan tankönyve, Medicina Könyvkiadó Zrt. 2011
- 4 K. Pavani Bharati; U. Ram Prashanth. (2011): Von Willebrand Disease: An overview. *Indian J Pharm Sci.* Jan-Feb; 73(1): 7–16. doi: 10.4103/0250-474X.89751
- 5 Sadler J. E.: A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 1994; 71: 520-525.
- 6 Tulassay Zsolt A belgyógyászat alapjai 2, Medicina Könyvkiadó Zrt., 2011, Azonosító: 978 963 226 300 7
- 7 Sadler J. E., Budde U., Eikenboom J. C. J., Favoloro E. J., Hill F. G. H., Holmberg L., Ingerslev J., Lee C. A., Lillicrap D., Mannucci M., Mazurier C., Meyer D., Nichols W. L., Nishino M., Peake I. R., Rogehiero F., Schneppenheim R., Ruggeri Z. M., Srivastava A., Montgomery R. R., Federici A. B., Working Party Von W. (2006): Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4: 2103-2114.
- 8 Schlammadinger Á., (2006): A von Willebrand faktor és a GB1b/IX/V komplex kóros működésének vizsgálata von Willebrand betegségben és Bernard-Soulier szindrómában. PhD értekezés
- 9 Huizinga E. G., Tsuji S., Romijn R. A., Schiphorst M. E, de Groot P. G., Sixma J. J., Gros P., (2002): Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science*, 297: 1176-1179.
- 10 Ruggeri Z. M.: Von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 1997; 100:S41-S46.
- 11 Savage B., Saldívar E., Ruggeri Z. M.: Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84: 289-297.
- 12 Savage B., Almus-Jacobs F., Ruggeri Z. M.: Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions i platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; 94:657-666.
- 13 Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR: The effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium exposed to citrated human blood. *Microvasc Res* 1980; 19: 352-365
- 14 Siedlecki C. A., Lestini B. J., Kottke-Marchant K., Eppell S. J., Wilson L. D., Marchant R. E.: Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 1996; 88: 2939-2950.
- 15 Y.N Avtaeva, I.S Melnikov, A.E Komlev, T.E Imaev, S.D Okhota, S.G Kozlov, Z.A Gabbasov. (2020): Shear stress induced activation of von Willebrand factor may predispose to gastrointestinal bleeding in syndrome of Heyde. *European Heart Journal*, 41(2) <https://doi.org/10.1093/ehjci/ehaa946.3820>
- 16 Savage B., Sixma J. J., Ruggeri Z. M. (2002): Functional self-association of von Willebrand factor during platelet adhesion under flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 425-430.
- 17 Dong J. F., Moake J. L., Nolasco L., Bernardo A., Arceneaux W., Shrimpton C. N., Schade A. J., McIntire L. V., Fujikawa K., Lopez J. A. (2002): ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood*. 100: 4033-4039.
- 18 Shobhit Gogia, Sriram Neelamegham. (2015): Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and related blood disorders. *Biorheology*, 52(5-6): 319-335 10.3233/BIR-15061
- 19 Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. (2001) Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem*, 276: 41059-41063.

- 20 Tsai HM. (1996) Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*, 87: 4235-4244.
- 21 Yulia K. Kushchenko, Aleksey V. Belyaev, Effects of hydrophobicity, tethering and size on flow-induced activation of von Willebrand factor multimers, *Journal of Theoretical Biology*, Volume 485, 2020,
- 22 Zhong R. (2012): Microfluidic Based Human Blood Plasma Separation. PhD Dissertation. West Virginia University
- 23 B. Munson, W. Huebsch, T. Okiishi, and A. Rothmayer (2013), *Fluid Mechanics*. Wiley
- 24 Zhou Y., Lee C., Wang J., (2018): The Computational Fluid Dynamics Analyses on Hemodynamic Characteristics in Stenosed Arterial Models. *Journal of healthcare Engineering*. <https://doi.org/10.1155/2018/4312415>
- 25 Baskurt O. K., Meiselman H. J., (2003): Blood Rheology and hemodynamics. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 29(5): 435-50. DOI:10.1055/s-2003-44551
- 26 Bröckel U., Meier W. Wagner G.: *Product Design and Engineering*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2013]
- 27 R. Darby (2001): *Chemical Engineering Fluid Mechanics, Revised and Expanded*
- 28 Damjanovich S., Fidy J., Szöllösi J. (2007): *Orvosi Biofizika*. Medicina Könyvkiadó Zrt.
- 29 Papaioannou G. T., Stefanadis C. (2005): *Vascular Wall Shear Stress: Basic Principles and Methods*. *Hellenic J Cardiol*. 46:9-15
- 30 Panigrahi, P.K. *Transport Phenomena in Microfluidic Systems*: John Wiley & Sons, pp. 13-19 (2016).
- 31 Chen, W.-M. et al. A novel gait platform to measure isolated plantar metatarsal forces during walking. *J. Biomech*. 43, 2017-2021 (2010).
- 32 Kärki, S., Lekkala, J., Kuokkanen, H. & Halttunen, J. Development of a piezoelectric polymer film sensor for plantar normal and shear stress measurements. *Sens. Actuators A Phys*. 154, 57-64 (2009).
- 33 Heywood, E.J., Jetter, D.C. & Harris, G.F. Tri-axial plantar pressure sensor: design, calibration and characterization. *The 26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, pp. 2010-2013 (2004).
- 34 Rajala, S. & Lekkala, J. Plantar shear stress measurements — A review. *Clin. Biomech*. 29, 475-483 (2014).
- 35 . Gnanamanickam, E.P., Nottebrock, B., Große, S., Sullivan, J.P. & Schröder, W. Measurement of turbulent wall shear-stress using micro-pillars. *Meas. Sci. Technol*. 24, 124002 (2013)
- 36 . Green, J.V. et al. Effect of channel geometry on cell adhesion in microfluidic devices. *Lab Chip* 9, 677-685 (2009).
- 37 Tae Hyeon Kim¹, Jong Min Lee¹, Christian D. Ahrberg² & Bong Geun Chung (2018): Development of the Microfluidic Device to Regulate Shear Stress Gradients, *BioChip J* (2018) 12(4): 294-303 *BioChip J*.12(4): 294-303 DOI 10.1007/s13206-018-2407-9
- 38 Gurka, R., A. Liberzon, D. Hefetz, D. Rubinstein, and U. Shavit. "Computation of Pressure Distribution Using PIV Velocity Data." (1997). Israel Institute of Technology. Web.
- 39 Bednarz, T., Domanski, L. and Taylor, J.A (2011). "Computational Fluid Dynamics using OpenCL – a practical introduction". ICMS 2011, Australia, 12–16. December 2011. W
- 40 Release History". [Online]. Elérhető: <https://www.comsol.com/release-history>. [Elérés: 03-szept-2018].
- 41 A. Ray, V. B. Varma, P. J. Jayaneel, N. M. Sudharsan, Z. P. Wang, és R. V. Ramanujan, „On demand manipulation of ferrofluid droplets by magnetic fields”, *Sens. Actuators B Chem.*, köt. 242, o. 760–768, 2017.
- 42 Leelőssyné Tóth Eszter: Részecske- és sejttanszport modellezése mikrofluidikai rendszerekben. PhD Disszertáció 2019.

- 43 Bastian E. Rapp, in *Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics*, 2017
- 44 Francesca Bragheri, Rebeca Martínez, Vázquez Roberto Osellame in *Three-Dimensional Microfabrication Using Two Photon Polymerization: Micro and Nano Technologies*, 2020
- 45 <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/history-of-microfluidics/>
- 46 Jacob B. Nielsen, Robert L. Hanson, Haifa M. Almughamsi, Chao Pang, Taylor R. Fish, and Adam T. Woolley *Microfluidics: Innovations in Materials and Their Fabrication and Functionalization*, 2019
- 47 Arman Naderi, Nirveek Bhattacharjee, and Albert Folch – *Digital Manufacturing for Microfluidics*, 2019
- 48 Lee-Woon Jang, Joohyung Lee, Md Enayet Razu, Erik C. Jensen, and Jungkyu Kim – *Fabrication of PDMS Nanocomposite Materials and Nanostructures for Biomedical Nanosystems*, 2015
- 49 Kathryn Haubert, Tracy Drier and David Beebe – *PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system*, 2006
- 50 <https://manufactur3dmag.com/difference-dlp-sla/>
- 51 <https://www.3djake.hu/anycubic-3d-nyomtatok-es-kiegeszitok/photon-mono-x>
- 52 https://cdn-3d.niceshops.com/upload/file/ANYCUBIC_Photon_Mono_X-English-V0.0.3-komprimiert.pdf
- 53 Aoythip Chunglok, Nantakan Muensit, and Chalongrat Daengngam - *Extreme Wetting-Resistant Multiscale Nano-/Microstructured Surfaces for Viscoelastic Liquid Repellence*, 2016
- 54 R. S. Johar and R. P. Smith (1993): “Assessing gravimetric estimation of intraoperative blood loss,” *Journal of Gynecologic Surgery*, vol. 9, no. 3, pp. 151–154,
- 55 Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis. *JAMA*. 1999;282(21):2035–2042.