



Doktori (PhD) értekezés tézisei

Részecske és sejtszeparációs módszerek vizsgálata és alkalmazása mikrofluidikai rendszerekben

Bányai Anita

Témavezető: Dr. Fürjes Péter

Ipari konzulens: Varga Máté

Budapest, 2024. december



Energiatudományi
Kutatóközpont



77 ELEKTRONIKA

I. A kutatás előzményei

A mikrofluidika területén az orvosdiagnosztikai alkalmazásokra fejlesztett Lab-on-a-chip (LOC) vagy miniaturizált teljes analitikai rendszerek (μ -TAS) térnyerésével a betegágy mellett, mentőkocsikban, vagy orvosi rendelőkben alkalmazható Point-of-Care (POC) diagnosztikai platformok alkalmazása nagy hangsúlyt kapott az utóbbi évtizedekben. A Covid-19 pandémia csak katalizátorként szolgált az öntesztelést segítő platformok elterjedésében, 2019-ről 2020-ra az in-vitro diagnosztika (IVD) globális piaca évi 25,2%-os növekedést ért el. [1] A vércukorszint ellenőrzése, a szívinfarktus, a sztrók stádiumának beazonosítása, a gyors lefolyású bakteriális-, vírusos fertőzések kimutatása pontos és azonnali mérési eredményeket kíván. Éppen ezért az orvosdiagnosztikában alkalmazott mikrofluidikai eszközfejlesztések célja: rövid időn belül, akár néhány nano- vagy mikroliter térfogatú mintából gyors, hatékony, és megbízható analitikai eredmények elérése, mely támogatja az orvosi döntéshozatalt a szükséges kezelések kiválasztásában.

A 77 Elektronika Kft. gyors húgyúti baktérium elemző mérőműszerének fejlesztése (RUBA – Rapid Urine Bacteria Analyzer) kapcsán merült fel az igény olyan fogyóeszközre, mely megfelelő mintaszállításra, -előkészítésre, sejt és részecske szeparálásra, dúsításra, illetve szenzorzónában történő laterális pozicionálásra alkalmas. A vizeletben a 60 μ m jellemző átmérőjű laphám sejtektől a változatos alakú és méretű alkotókon keresztül (kristályok, gomba, véralkotók), akár az 1-4 μ m nagyságú baktériumok is megtalálhatók. Az elsődlegesen vizsgált jelölésmentes sejtszeparálás előnye, hogy komolyabb mintaelőkészítés nélkül elvégezhető, a szegregálhatóság alapját a sejtek fizikai paramétereinek változatossága – méret, alak, sűrűség, rugalmasság, polarizálhatóság – adja.

Szeparálási módszerek között két nagyobb csoport különböztetünk meg. Az aktív szeparálási módszerek külső erőforrás bevonását igénylik: ide tartoznak a mágneses, akusztoforetikus, dielektroforetikus, és optikai megoldások. Ezzel szemben külső erőforrást nem, de gondosabb geometriai tervezést igényelnek a

passzív megoldások: a determinisztikus oldal irányú térítés, a tehetetlenségi és Dean-áramlási szeparálási lehetőségek, illetve egyéb szűrések és társaik.

Minden módszernek van előnye és hátránya, a legfontosabb kérdés a módszer alkalmazásának specifikálása, és meghatározó paraméterei. A dielektroforetikus szeparálás nagy méretfelbontással, valós idejű fókuszálásra képes, azonban alkalmazhatósága nagyban függ a médium vezetőképességétől és a biológiai minták sérülékenységétől. A mágneses szeparálás előnye, a nagy áteresztőképesség: klinikai alkalmazásban is jelentek már meg olyan mikrofluidikai megoldások, melyben 15 perc alatt 50-100 ml mintából voltak képesek *E.coli* [2], szepszist okozó baktériumokat megkötni 10 CFU/ml koncentrációban [3]. A hatékonyság további növelését célzó stratégiai megközelítések között legfontosabbak a fluidikai csatorna geometriájának illetve, a mágneses gyöngyök méretének és célspecifikus felületkezelésének optimalizálása.

A passzív szeparációs módszerek előnye, hogy a szűrés az alkalmazott médium, vagy célminta valamely specifikus tulajdonságára optimalizálható.

1) Az **oldalirányú térítés (DLI)**, jelölésmentes módszer a sejtek szétválasztására, szegregációjára, vagy részecske és sejtpopulációk dúsítására. Alapjait egy soronként eltolt oszloprendszer képezi, melyben a periodicitás mértéke és az oszloptávolság határozza meg a kritikus részecskeátmérőt (D_c), mely fölött a részecskék eltérítése megvalósul. Alapjait Huang et al. fektette le kör keresztmetszetű oszlopok esetére. [4] A módszer kihívásai közé tartozik a nem-gömb alakú, deformálódó entitások elválasztása, melyek az áramlásban folyamatosan változtathatják alakjukat és mozgásformájukat az oszlopok közelbe érve. A módszer alkalmas lehet egészséges – rugalmasabb – és maláriával fertőzött – rigidebb – vörösvértestek elválasztására [5], illetve bizonyos esetekben a mikron alatti tartományban is működhet.

2.) A **keresztáramlásos szűrés (CF)** egy nyomásvezérelt membrán folyamat, mely kisméretű részecskék szeparálására, mikroorganizmusok, valamint emulziós cseppek elkülönítésére is alkalmas. A (dead-end) zsákszűrő típusú eljárásokkal

szemben, ebben az esetben a szűrő felszíne párhuzamosan helyezkedik el az áramlás irányával, ami jelentősen csökkenti az eltömődés lehetőségét. A CF technológiát általában más szeparációs módszerrel kombinálva használják. Az irodalomban fellelhető megoldások hatékonyságának összehasonlítása nehéz az eltérő pórusméretek, szűrés idő, minta összetétel és koncentráció miatt. A jellegzetes oszlopos, és duzzasztógát típusú szűrő-elrendezést alkalmazó mikrofluidikai rendszerek közül az utóbbi az irodalomban hatékonyabb szűrést mutat [6]: 10 µl/perc áramlási sebesség, 10⁴ sejt/µl koncentráció mellett 82,3 % -os hatásfokot értek el az oszlopos, és 91,2 %-es hatásfokot a gát típusú elrendezéssel vörösvértestek elválasztása során. Vizsgálataim is ezekre a szűrőtípusokra terjedtek ki.

3.) A **laterális fókuszálás** folyamatos és nagy áteresztőképességű módszer, funkcióját tekintve homogén eloszlású részecskéket rendez lamináris módon egyetlen áramvonalba a tehetetlenségi emelő erőket kihasználva. A részecskeméret, a csatorna geometriája, keresztmetszete és az áramlási Reynolds-szám is befolyásolja a részecskék kialakuló fókuszpontjainak pozícióját egy mikrofluidikai csatorna keresztmetszetében. A különböző méretű részecskék más-más egyensúlyi pozíciót foglalnak el áramlásban. Kísérleteim során Dino Di Carlo et. al. [7] tanulmányát vettem alapul, melyben aszimmetrikus hullámcsatornában meghatározta a fluidika fókuszálási kritériumait ($a / D_h > 0,07$) a részecskeátmérő (a) és a csatorna hidradinamikai átmérője (D_h) közötti arányát figyelembe véve. A csatorna keresztmetszetben ellentétesen forgó Dean örvények szintén befolyásolhatják a fókuszálás mértékét. A részecskére ható nyíróerő szintén jelentősen befolyásolja azok csatornában felvett mozgásformáját, emiatt több biológiai célsejt (vörösvértest, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba, HeLa sejt) laterális fókuszálódását is vizsgáltam polisztirol gyöngyök viselkedésével is összevetve. A módszert alkalmazzák rákos sejtek szűrésére, véralkotók vagy baktériumok szeparálására, akár nem-newtoni folyadékként viselkedő minták (tej, hígítatlan vér) esetén is.

II. Célkitűzések

Kutatómunkám során olyan mikrofluidikai rendszerben kivitelezhető passzív és aktív manipulációs elven működő részecskeszeparációs megoldásokat vizsgáltam, melyek célja 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. A RUBA (Rapide Urine Bacteria Analyzer), azaz gyors húgyúti baktérium elemző készülék fejlesztése során a közvetlen cél baktériumok ($\varnothing < 4 \mu\text{m}$) szűrése és áramlásban történő pozícionálása volt.

Ennek megfelelően olyan mikrofluidikai mintaelőkészítő szerkezetek fejlesztésén dolgoztam, melyek alkalmasak a baktériumok mérettartományán kívüli eső, a későbbi mérési feladatokat esetlegesen befolyásoló alakos elemek szűrése, elválasztására, illetve megvizsgáltam a különböző méretű alakos elemek érzékelő területen történő koncentrálásának 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.

Tanulmányomban vizsgáltam a hidrodinamikai elveken alapuló passzív szeparációs megoldások, mint **az (1) oldal irányú térítés (DLD)**, **a (2) laterális fókuszálás (LF)** és **a (3) keresztirányú szűrés (CF)**, valamint **az aktív (4) mágneses csapdázás** elválasztási hatékonyságát, és azok integrálhatóságát.

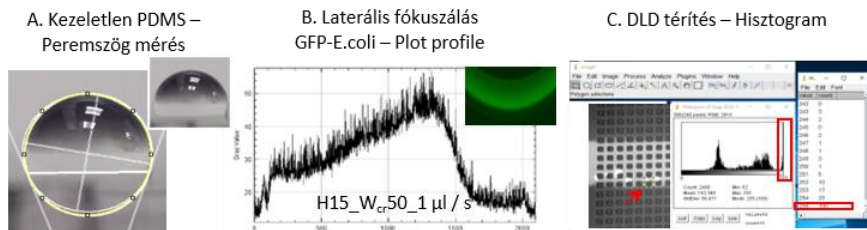
III. Vizsgálati módszerek

1. Mikrofluidikai rendszerek kialakítása. A laboratóriumi kísérletekhez alkalmas mikrofluidikai rendszereket lágy litográfiás [8] módszerekkel állítottam elő. A geometriai terveket maszktervező szoftver (Clew5) segítségével rajzoltam meg, amelyek alapján a mintázat króm maszkjai direktírással (Heidelberg DWL 66) elkészültek. Az optikai litográfiához 4 inches szilícium szeletre vittük fel az SU-8 negatív fotoreziszt réteget a kívánt fluidikai csatorna magasságának megfelelő rétegvastagságban, majd ebben képeztük le a mikrofluidikai rendszer negatívjának mintázatát. Replikakészítéshez a két komponensből keverhető poli-dimetilsziloxán (PDMS) polimert alkalmaztam (Sylgard 184). A hibrid PDMS-üveg mikrofluidikai eszköz szivárgásmentes kötéséhez oxigénplazmás felületkezelést alkalmaztam, mely elősegíti a kovalens kötés kialakulását. A fluidikában az áramlást RS232 ADDR fecskendőpumpával biztosítottam.

2. Fluoreszcens vizsgálatok. A mérésekhez nagysebességű kamerával (Zeiss Axio IC m1; Zeiss Axio 512 mono) felszerelt Zeiss Axio Vert.A1 fluoreszcens mikroszkópot alkalmaztam. *Laterális fókuszálás* vizsgálata során a nagy expozíciós idővel készült felvételek lehetővé tették az eltérő méretű fluoreszcens gyöngyök pályavonalainak vizsgálatát, és laterális pozíciójuk meghatározását, így a részecske szeparálás, dúsítás, szűrés folyamatának valós idejű megfigyelését. A változatos méretű fluoreszcens polisztirol gyöngyök mindegyikéhez egyedi emissziós hullámhosszt választva lehetővé vált azok együttes megfigyelése és jelenlétük kimutatását szűrletben. A fluoreszcens jelöléssel nem rendelkező biológiai minták esetén sötét látóteret felvételek készültek. Az adott hullámhosszon felvett képek ZEN 2.6 (Blue Edition) szoftverben színezéssel együttesen is ábrázolhatóvá váltak.

3. Kiértékelés. A felvételek kiértékeléséhez az ImageJ 1.52a szoftvert alkalmaztam, mely különböző bővítményekkel alkalmas (1) peremszögmérések kiértékelésére, (2) fluoreszcens oldat hígulásának detektálására a pixel-intenzitás ismeretében, és (3) adott területen fellelhető gyöngyök számának meghatározására fluoreszcens, szűrkeskálás felvételen a gyöngyméret és pixelszám ismeretében.

A keresztáramlásos szűrés, illetve a mágneses csapdázás vizsgálata során a részecskeoldatok, 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 kamrák felhasználásával.



1. ábra Image J szoftver bővítményeinek alkalmazása

A kísérletekhez elsősorban fluoreszcens polisztirol gyöngyöket használtam különböző méretben ($\varnothing = 0,5 - 20,4 \mu\text{m}$), illetve az eltérő alakú és méretű biológiai minták között szerepelt GFP-t (Green Fluorescent Protein) expresszáló E. coli, vörösvértest, Saccharomyces cerevisiae élesztősejt, valamint rákos sejtvonalból származó HeLa sejt is. A mágneses méréshez neodínium mágnes mellett $\varnothing = 2,8 \mu\text{m}$ Dynabeads gyöngyök kerültek alkalmazásra.

A kísérleti eredményeket végeelem modellekkel (COMSOL Multiphysics) is összevettem a laterális fókuszálás és a magnetoforetikus csapdázás vizsgálata során. Numerikus módszerekkel elemeztem a csatorna keresztmetszet, valamint az áramlási sebesség változtatásának szerepét a fejlődő Dean-örvények kialakulásában, illetve azok hatását a különböző átmérőjű gyöngyök csatornakeresztmetszetben elfoglalt laterális pozíciójára és a gyöngyeloszlásra. Összevettem a fluoreszcens gyöngyök kísérletekben tapasztalt áramlási sebesség függő laterális pozícióját a hasonló paraméterek beállítása mellett szimulált Poincaré térképekkel. Mágneses csapdázás vizsgálata során végeelem szimulációk eredményeivel demonstráltam és támasztottam alá a mikrostruktúrák körül kialakuló sebességtér mágneses gyöngyök kitapadására gyakorolt hatását.

IV. Új tudományos eredmények

IV.1 Determinisztikus oldal irányú térítés

A **DLD (determinisztikus oldal irányú térítés)** kísérletek során egy előre definiált cut-off érték (kör alakú oszlopok esetén $D_c = 13,3 \mu\text{m}$) alapján történt az oszloprendszer kialakítása. A pillérek alakja és konfigurációja nemcsak a részecske-szeperációs hatást, hanem a lamináris áramlásban tapasztalható áramlási jellemzőket is befolyásolja, a D_c érték az oszlopközben kialakuló áramvonalak szélessége alapján hangolható. Tervezés során vizsgáltam az oszlopalak szeperálási jelenségre gyakorolt hatását, illetve az abból származó áramlási anizotropia jelenségéből adódó, hatékonyságot befolyásoló tényezőket. A kísérleti eredmények értelmezéséhez végeelem modellt építettem, ami az oszlopresekben kialakuló sebességprofil meghatározásával alátámasztja a szeperációs hatékonyság tapasztalati sorrendjét – figyelembe véve a sebességmaximumok helyét és értékét. Szimmetrikus (négyzet alapú) és aszimmetrikus (különböző orientációjú derékszögű háromszög alapú) oszlopokat tartalmazó DLD mikrofluidikai rendszerek alkalmazásával vizsgáltam a kialakuló áramlástanai viszonyok hatásait a részecskék eltérülésére.

I.1. TÉZIS

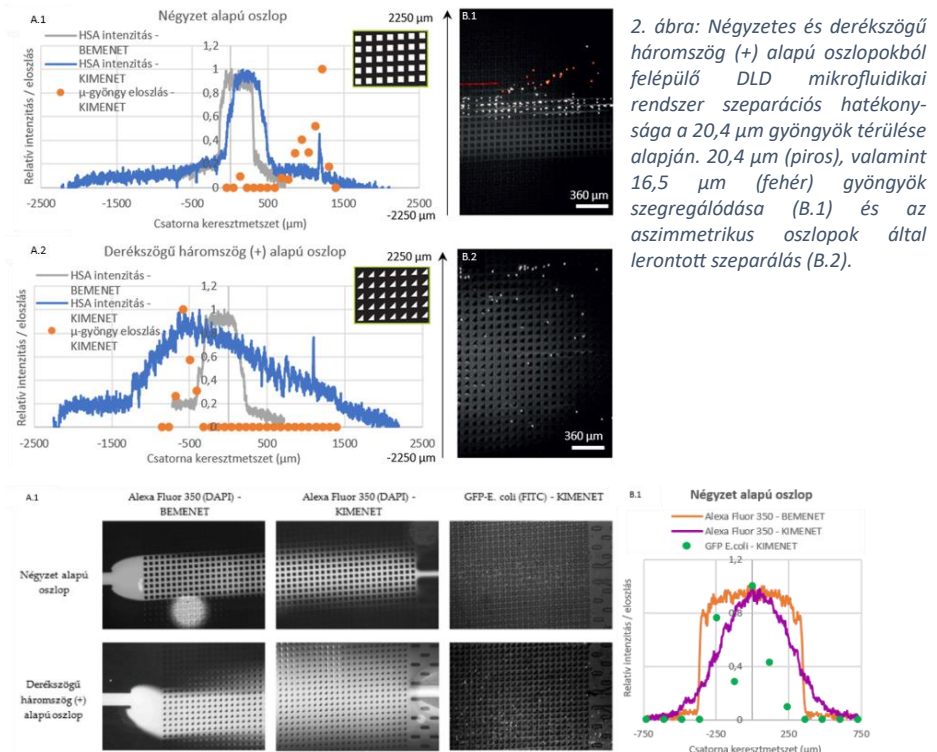
Hat különböző (négyzet, kör, és különböző orientációjú egyenlő szárú és derékszögű háromszög alapú hasáb) oszlopgeometriával rendelkező DLD mikrofluidikai szerkezet szeperációs hatékonyságát összehasonlítva megállapítottam, hogy az oszlopok között kialakuló sebesség- és nyomáseloszlás jelentősen befolyásolja a részecskék oszlopmátrixban 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, $\sim 1000 \mu\text{m}$ szeperációs eltérítést a vizsgált $20,4\mu\text{m}$ átmérőjű részecskékre, 20 oszlopperiodust figyelembe véve. (lásd 2. ábra) ____ 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 hatásfokát. A megadott geometriai paraméterekkel jellemezhető aszimmetrikus (különböző orientációjú derékszögű háromszög alapú) oszlopokat tartalmazó DLD mikrofluidikai rendszerekben a mintaoldat laterális kiterjedése a bemeneti, fókuszált értékének 255 - 363 %-ára szélesedik, így az alakos elemek nem szeparálódnak ettől a tartománytól.

(lásd 3. ábra)

Tudományos közlemény: Po3



3. ábra: Áramlási viszonyok a négyzet alapú, illetve aszimmetrikus derékszögű háromszög alapú oszlopokat tartalmazó DLD szerkezetekben. D. (kritikus átmérő) alatti célminta (*GFP-E.coli*; $\phi=0,5-2$ μm, pálcika alakú) a fluoreszcens Alexa Fluor oldattól nem térülve mozog az oszloprendszerben. Az aszimmetrikus oszlopszerkezet miatt kialakuló áramlási tér jelentősen kiszélesíti a célminta eloszlást a mikrofluidikai rendszerben.

IV.2 Keresztáramlásos szűrés

Kísérleteim során (1) keresztcsatornákat tartalmazó szűrőszerkezet esetén elemeztem a keresztiszűrési mikrofluidikai rendszer elválasztási hatékonyságát a szűrőcsatornák és a fő áramlási csatornák magasságarányának függvényében. A mikrofluidikai rendszer minden esetben egy 500 μm széles főcsatornából és két 200 μm széles oldalcsatornából, valamint a közöttük kialakított párhuzamos szűrőszerkezetből áll; a bemeneti tömegáramlási sebesség 0,5 $\mu\text{l/s}$ volt. (2) A duzzasztógát típusú szűrőszerkezet esetén vizsgáltam a fő és mellékcsatorna hidrodinamikai ellenállásainak hatását a szűrés hatékonyságára – amit a főcsatorna szélességének (500 / 300 μm) és a mellékcsatorna magasságának (50 / 25 μm) változtatásával értem el, 5 μm -es szűrőrésszel. Kísérleteimben a vizeletben megtalálható alakos elemekre jellemző méretű részecskéket alkalmaztam (E. coli – 1,97 μm , vörösvértest – 6,08 μm , fehérvérsejt – 15,8 μm). Vizsgáltam a szűrési folyamat érzékenységét a keresztáramlás sebességére, a transzmembrán nyomásra, a membrán és a kialakuló tömörödési réteg hidrodinamikai ellenállására, valamint a szuszpenzióban található részecskék méretbeli eloszlására.

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.

(lásd 4.A ábra)

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

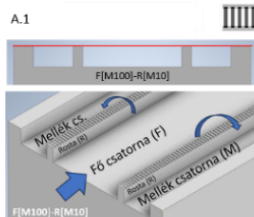
nem specifikus alakos elemek jelenlététől. A mintába kevert 6,08 μm és 15,8 μm átmérőjű gyöngyök mellett az átszűrt *E. coli* baktériumok hozama ~35 %-kal csökkent. A szűrési mérettől nagyobb elemek miatt a szűrő felületen kialakuló szűrési tömörülési réteg jelentősen akadályozza a célsejtek átjutását a szűrletbe.

(lásd 4.B ábra)

Tudományos közlemény: Po2

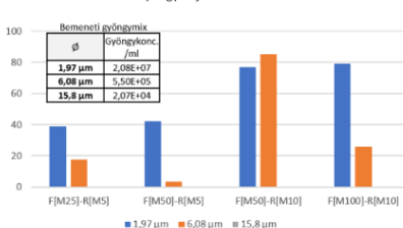
A. Keresztcatornás szűrés

A.1



A.2

Gyöngyök jelenléte a szűrletben



Jelölések:

F (főcsatorna)

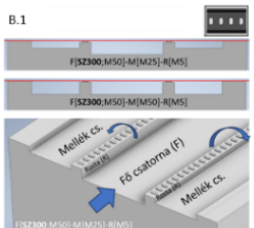
M (mellékcatorna)

R (rosta)

[Sz; M][szélesség; magasság].

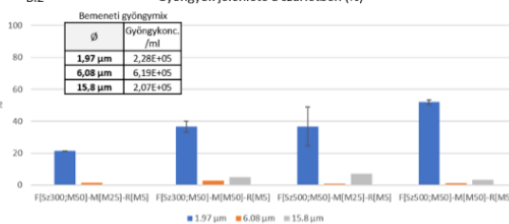
B. Duzzasztógát típusú szűrés

B.1

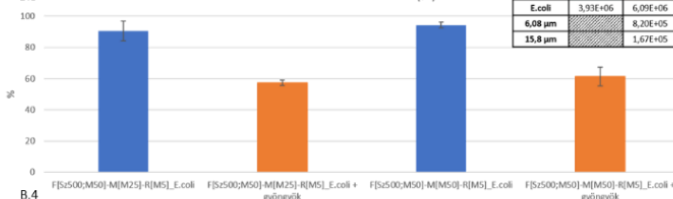


B.2

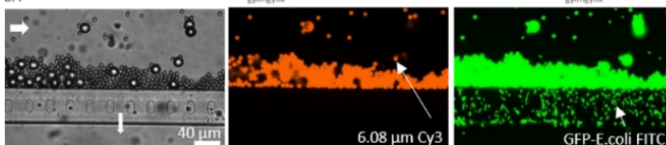
Gyöngyök jelenléte a szűrletben (%)



B.3 E.coli tartalom a szűrletben (%)



B.4



4. ábra: A szűrés hatékonysága keresztcatornákat tartalmazó (A.), illetve duzzasztógát típusú szűrőelrendezésben (B.) szűrőelrendezésben. Különböző geometriákban (A.1-B.1) tapasztalt szűrési hatékonyság (A.2-B.2) azonos ϕ 15,8; 6,08; 1,97 μm gyöngyméretek mellett. A szűrletben detektálható *E. coli* mennyisége (B.3) gyöngyök nélküli (kék) és gyöngyöket is tartalmazó minta esetén (narancssárga) duzzasztógát típusú elrendezésben F[Sz500;M50] főcsatorna méretek, illetve M[M50] és M[M25] mellékcatorna magasságok mellett. A szűrőfelületén kialakuló tömörülési réteg (B4.).

IV.3 Laterális fókuszálás

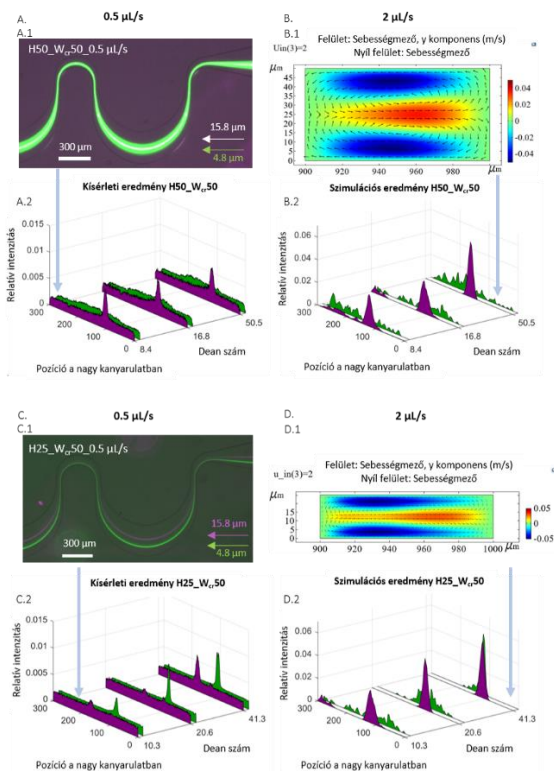
Periodikusan változó keresztmetszetű, aszimmetrikus kanyarulatokból felépülő mikrofluidikai csatornában vizsgáltam a csatorna geometriai paramétereinek hatását a különböző méretű részecskék szétválasztási hatékonyságára. A hidrodinamikai folyamatokat végeelem modell segítségével értelmeztem, a kialakuló elnyújtottabb Dean örvények fókuszáló hatását azonosítva a mikrofluidikai rendszerben. Az alkalmazott fluidikai egység 23 kanyarulatból állt; magasságát $H = 100, 50, 25, 15 \mu\text{m}$; kritikus keresztmetszetét $W_{cr} = 50, 100, 150 \mu\text{m}$ között választottam meg. A célzott biológiai alkalmazásoknak megfelelően a mikrofluidikai rendszert 15,8 és 4,8 μm átmérőjű gyöngyök pozícionálására optimalizáltam, 0,5 – 1 – 3 – 5 – 6 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebességek mellett. A kísérleti tapasztalatokat összevettem végeelem modellek numerikus eredményivel, vizsgálva a csatorna-keresztmetszet, valamint az áramlási sebesség hatását a kialakuló Dean-örvények viselkedésére. Elemeztem a különböző átmérőjű gyöngyök pályavonal-számítások alapján meghatározott Y koordináta szerint elfoglalt laterális pozícióját és eloszlását a csatorna-keresztmetszetben.

Vizsgáltam $H=25 - W_{cr}=50$ paraméterekkel jellemezhető struktúrában, hogy a felvett modellgyöngy pozícióterkép mennyire adja vissza a választott biológiai sejtek viselkedését: *E. coli* [0,5-2 μm ; pálcika], vörösvértest [2,5; 6-8 μm ; korong alakú bikonkáv], *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba [5-10 μm ; kerek vagy ovális], illetve HeLa sejtvonal [16-29 μm ; változatos, inhomogén, szuszpenzióban gömb] esetén, melyek nemcsak méretben, de alakban is eltérőek. A pozícióterkép felállításához a következő gyöngyméreteket használtam: $\varnothing = 0,5 - 1,1 - 1,97 - 2,9 - 4,8 - 5,4 - 6,08 - 10,2 - 15,8 - 16,5 \mu\text{m}$. 25 és 15 μm magas csatornában vizsgáltam az *E. coli* baktériumok további fókuszálásának lehetőségét. A fókuszálás nehézségét az adja, hogy az *E. coli* pálcika alakú, kisebbik dimenziója 0,5 μm , nagyobbik 2 μm körül mozog, és jóval deformálhatóbbak, mint a polisztirol gyöngyök.

Szimulációkkal is alátámasztható, hogy az áramlási sebességek emelésével, a csatorna keresztmetszet csökkentésével, vagy a csatornahossz, illetve periódusszám növelésével javítható a fókuszálás hatékonysága. Emellett figyelembe kell venni az alkalmazott biológiai célminta érzékenységét a nyíróerőkre, valamint a csatorna áteresztőképességét, vagy a miniatürizálás lehetőségeit – hosszú csatorna geometria alkalmazásánál.

III.1. TÉZIS

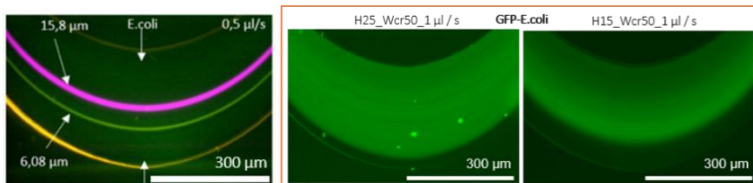
Megállapítottam, hogy a csatorna magasságának csökkentésével ($50\ \mu\text{m} \rightarrow 25\ \mu\text{m}$) jelentősen javítható a kisebb méretű gyöngyök fókuszálásának hatékonysága, és a részecskék pozíciójának méret szerinti elkülönítése. A leghatékonyabb $25\ \mu\text{m}$ magassággal és $50\ \mu\text{m}$ 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. (lásd 5. ábra) Tudományos közlemény: P2, P3



5. ábra: Rigid polisztirol gyöngyök ($\varnothing 4,8$ és $15,8\ \mu\text{m}$) viselkedésének szemléltetése eltérő oldalirányú kritikus keresztmetszettel rendelkező $H50_{W_{cr}50}$ és $H25_{W_{cr}50}$ fluidikai csatornában $0,5 - 1 - 2\ \mu\text{l/s}$ 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).

III.2. TÉZIS

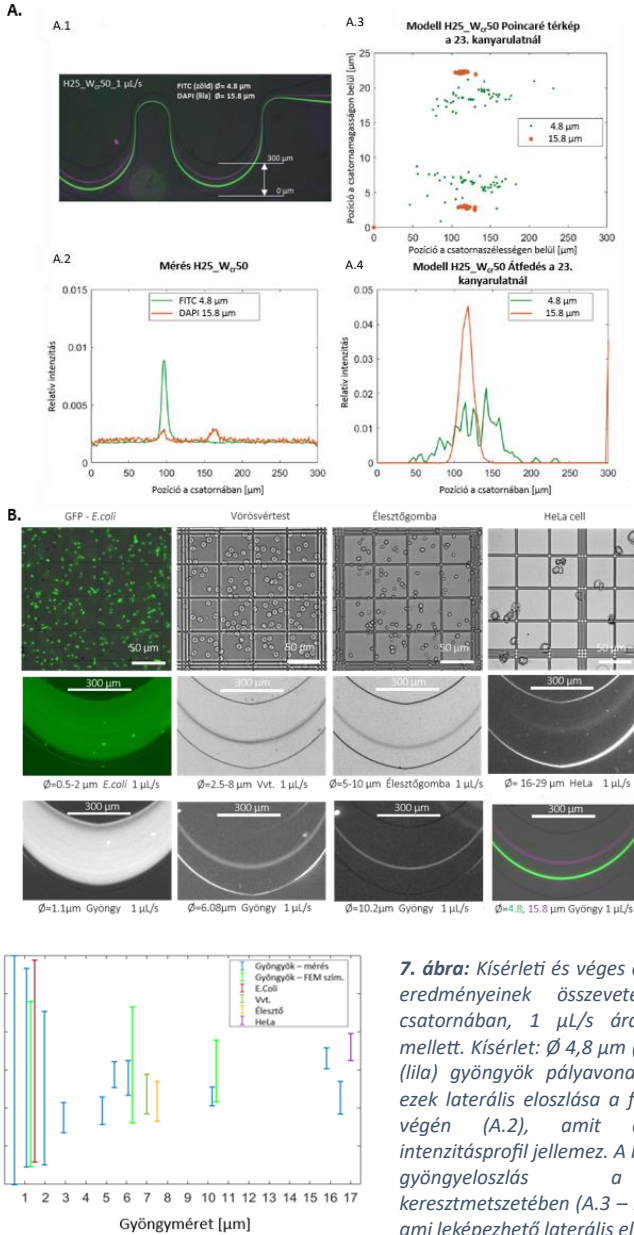
Kísérletekkel bizonyítottam, hogy az általam alkalmazott periodikusan változó keresztmetszetű, aszimmetrikus kanyarulatokból felépülő mikrofluidikai csatornában a magasság jelentős csökkentésével javítható a célminta *E. coli* baktériumok koncentrációs határfoka is. 15 μm magas mikrofluidikai csatornában, 1 $\mu\text{l/s}$ -os térfogatáramnál a 300 μm széles csatorna keresztmetszetének 77 %-ára koncentrálódik a sejtpopuláció. (lásd 6. ábra) Tudományos közlemény: P1



6. ábra: *E. coli* koncentrációjának mértéke periodikusan változó keresztmetszetű mikrofluidikai csatornában 0,5 és 1 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebességek mellett. Az *E. coli* nagyobb mértékű koncentrációját a csatorna magasságának csökkentésével sikerült elérni.

III.3. TÉZIS

Kihasnálva az alkalmazott mikrofluidikai rendszer periodikusságát, ciklikusan ismétlődő végelem modellt javasoltam, amelynek kimeneti paramétereit (sebességtér, részecske pályavonalak) ismét a bemeneti oldalon definiálva, tetszőleges hosszúságú mikrofluidikai rendszer viselkedése modellezhető moderát erőforrásigény mellett, annak legyártása nélkül, csupán digitális ikrének definiálásával. Legyártott fluidikai rendszerben vizsgálva és összehasonlítva célsejtek és polisztirol gyöngyök áramlási viselkedését, meghatároztam a változatos morfológiájú *E. coli*, vörösvértes, élesztőgomba, és HeLa sejtekkel ekvivalens rigid gömb átmérőket: 1–2 μm , 5–6 μm , 10 μm , 15–17 μm . Végelem 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. (lásd 7. ábra) Tudományos közlemény: P1



7. ábra: Kísérleti és véges elem szimulációk eredményeinek összevetése H25_W_{cr}50 csatornában, 1 μL/s áramlási sebesség mellett. Kísérlet: Ø 4,8 μm (zöld) és 15,8 μm (lila) gyöngyök pályavonalai (A.1), illetve ezek laterális eloszlása a fluidikai csatorna végén (A.2), amit a fluoreszcens intenzitásprofil jellemez. A FEM szimulációk: gyöngyeloszlás a csatorna keresztmetszetében (A.3 – Poincaré térkép), ami leképezhető laterális eloszlássá (A.4).

Biológiai sejtek (B.1 - B.2) és polisztirol gyöngyök (B.3) laterális fókuszálásának összehasonlítása: biológiai minta modellezésére használt ekvivalens gyöngyméretet a laterális fókuszálási pozíció átfedésével határoztam meg. Fókuszálási pozíciótérkép különböző méretű rigid polisztirol gyöngyök és biológiai célsejtek esetén (C); a grafikonban látható egyes méretek modellezés alapján számolt laterális pozíciója

IV.4 Mágneses szeparálás

A mágneses csapdázás hatékonyságának morfológia és áramlási sebesség függését elemeztem kísérleti mérések és végeselem szimulációk segítségével. Mágneses mikrogyöngyök viselkedését különböző áramlási viszonyok között vizsgáltam, minél nagyobb csapdázási hatékonyság elérését célozva. A szűrési feladatok megvalósítása során elsődleges szempont a nagy átteresztőképesség és a hatékonyság biztosítása, azonban az áramlási sebesség növelése sok esetben rontja a célminta csapdázhatóságát. Olyan geometriai inhomogenitásokat alkalmaztam a mikrofluidikai rendszerben, melyek nagyobb globális áramlási sebesség esetén is javítani tudják a csapdázási hatékonyságot az áramlási tér lokális módosításával. A kísérleti eredményeket összevettem FEM szimulációs módszerek eredményeivel. A javasolt lokális csapdázási megoldásokat autonóm mikrofluidikai rendszerekben is alkalmaztam.

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 pályavonalak kialakulása miatt – a részecskék nagyobb arányban csapdázódnak a csatorna alsó felületén. (lásd 8. ábra)

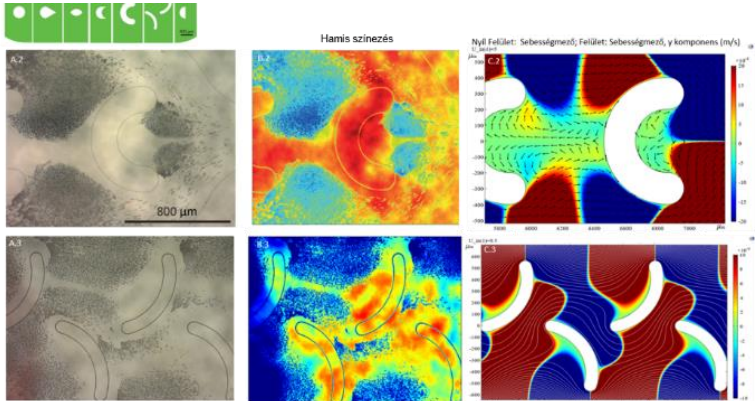
Tudományos közlemény: Po1

IV.2. TÉZIS

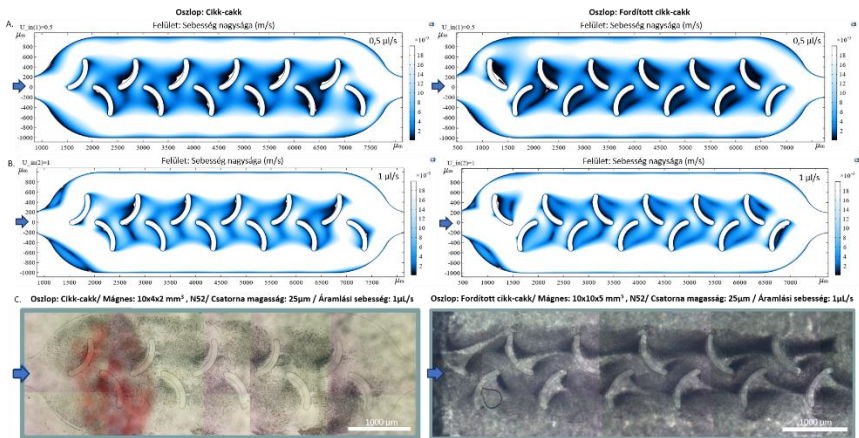
Végeselem modell felépítésével megmutattam, hogy a numerikusan számolt sebességtér alkalmas a mágneses részecskék csapdázási helyzetének és lokális csapdázási hatékonyságának előrejelzésére – vagyis a modell alkalmas magnetoforetikus szeparációs szerkezetek digitális ikerként történő alkalmazására.

(lásd 9. ábra)

Tudományos közlemény: Po1



8. ábra: Mikrogyöngyök mágneses csapdázása 25 μm magas fluidikában 1 $\mu\text{L/s}$ áramlási sebesség mellett fektetett U és periodikus ív alakú oszlopok körül (A). A kísérletek felvételeinek hamis színezése: kék – csapdázott gyöngy, piros – gyöngy hiánya (B). Végeelem modellel számolt áramlássebesség eloszlás a struktúrák körül (C.); 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.



9. 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). 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. (C)

V. Az eredmények hasznosítása

A mikrofluidikai kazetták elsődleges feladata, hogy megoldja, illetve segítse a mérendő analit (legyen az baktérium, fehérje, vírus, DNS, RNS stb.) adott mintából (pl. vérszérum, vizelet, ivóvíz stb.), minél nagyobb pontossággal és érzékenységgel történő kimutatását, a célzott alkotó és a mérést zavaró egyéb elemek (sejtek, törmelékek stb.) elválasztásával. Aplikációs szempontból az eszközöket főleg diagnosztikai vagy monitoring feladatokra fejlesztik, leginkább orvosi célú felhasználásra, ahol fontos, hogy a mérést minimális mintatérfogatból, minél rövidebb idő alatt oldják meg. A Lab-on-a-Chip rendszerek tehát olyan integrált mintaanalitikai eszközök, melyek képesek kiváltani a bonyolult laboratóriumi műveletek sorozatát és a mérést az ellátás helyén elvégezni. A részecske vagy analit szeparálási és koncentrálási eljárások a mikrofluidikai mintapreparációs lépések közül talán az egyik legnagyobb kihívást támaztató funkciók.

Aplikációs oldalról megvizsgálva az eredményeket kijelenthető, hogy a passzív elválasztási és koncentrálási technikák főleg olyan esetekben használhatóak, amikor a mikrofluidikai kazetta működtetését nyomásvezérelt külső pumpával (fecskendő, perisztaltikus, piezo, egyéb) biztosítjuk, és a megnövelt áramlási sebesség nem kritikus méréstechnológiai oldalról. Olyan esetekben is alkalmazhatóak, ahol a mikrofluidikai kazettában kialakított dedikált szenzor zónában olyan erős az analit és a felismerő ágens közötti kölcsönhatás, hogy a növelt áramlási sebesség számottevően nem csökkenti a rendszer érzékenységét. Természetesen számos olyan aplikációs eset is van, ahol a magas áramlási sebesség már jelentős hátrány és számottevő érzékenység csökkenést okozhat. Az autonóm mikrofluidikai rendszerek előnye klinikai alkalmazások esetén, hogy a kazetta és a műszer között nincs fluidikai kapcsolat, így a kazetta önálló zárt egységet alkot, így mérést követően eldobható. Itt a csatornafalak felületi tulajdonságainak pontos beállítása, azok időbeni állandósága, a precíz, kontamináció mentes kazettagyártás hatványozottan kritikus paraméterek.

Az, hogy adott esetben melyik technológia az optimális, azt elsősorban a klinikai igények, másodsorban pedig a fejlesztés alatt álló rendszer határozza meg. Kutatásom eredményei ezt a döntést támogatják mégpedig, hogy bizonyos, gyakran vizsgált mikrométeres vagy nagyobb alakos elemek esetén (pl. baktérium, vörösvértest, élesztőgomba, vagy keringő tumor sejt – CTC), melyik passzív vagy aktív elválasztási megoldás lehet célravezető adott rendszerbeállítások mellett.

VI. Irodalmi hivatkozások listája

- [1] „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>
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] „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
- [7] D. Di 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.
- [8] Y. Xia és G. M. Whitesides, „Soft Lithography”, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, köt. 28, sz. 1, o. 153–184, 1998, doi: 10.1146/annurev.matsci.28.1.153.

VII. A tézispontokhoz kapcsolódó tudományos közlemények

VII.1 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>
Sensors - Q1; IF 3.9; Hivatkozások száma: 1 (Független)
- 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>
Sensors - Q1; IF 3.9; Hivatkozások száma: 1 (Független); 1 (Függő)

P3 Bányai Anita, Bató Lília, Leelőssyné Tóth Eszter, Varga Máté, Fürjes Péter*
Áramlástanai jelenségek mikroszkopikus mérettartományban – mikrofluidikai,
Fizikai Szemle

VII.2 Konferencia megjelenések

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)

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 ; 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

VIII. További tudományos közlemények

VIII.1 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>; Biosensors - Q1; IF 5.4; Hivatkozások száma: 4 (Független); 3 (Függő)

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>; Microelectronic Engineering – Q2; IF 2.3; Hivatkozások száma: 30 (Független); 2 (Függő)