

1. Studii si experimente preliminarii privind componentele si arhitectura biochipului

1.1. Arhitectura biocipului

Metodele de procesare a mostrelor de ordinul microlitrilor care contin celule sunt foarte solicitate pentru o larga arie de aplicatii, precum: cercetarea biomedicala, diagnostic medical, anti-terorism, analiza mediului, biotehnologii. Dezvoltarea unei analize cantitative si calitative a celulelor necesita identificarea si izolarea unor anumite celule dintr-un amestec complex. In plus, pentru a obtine informatii reproductibile, este necesara o metoda de purificare fiabila si non-distructiva. Totusi, separarea eficienta a celulelor nu este o aplicatie triviala. In plus fata de dificultatile prezentate de separarea in sine, procesul este mult complicat de complexitatea celulelor si a mostrei de sortat. De exemplu, celulele umane sunt foarte fragile in comparatie cu alte celule, si sunt mult mai sensibile la schimbarile aparute in mediu.

La scara macroscopica, au fost fabricate sisteme eficiente si rapide pentru separarea celulelor, folosind diferite tehnici: citometria, centrifugarea si filtrarea. Din pacate aceste metode conventionale prezinta dezavantaje majore, celulele sortate fiind diluate si dispersate. Eforturile de a reduce volumele si energia necesara pentru separare s-au concretizat printr-un numar de dispozitive miniaturizate care folosesc avantajele microfluidicii si tehnicilor de microfabricatie. Aceste avantaje oferite de tehnicile microfluidice de sortare si separare includ un control mai precis asupra mediilor celulare, un volum semnificativ mai mic de reactiv si timpi mult mai mici pentru reactie in analizele biochimice. Acest lucru permite micsorarea spatiului necesar, dar si scaderea semnificativa a costurilor: monocelule sau celule rare pot fi manipulate neinvaziv; permite procesarea in paralel a mai multor reactii; permite automatizarea usoara a proceselor.

Citometria este o tehnica conventionala folosita pentru numararea, examinarea si sortarea microscopica a particulelor suspendate intr-un fluid. Permite analiza simultana a mai multor parametri fizici sau chimici ai unei

celule care curge printr-un sistem de detectie optic sau electromagnetic. Sistemele citometrice moderne permit analize rapide si fiabile. Totusi, aceste aparate ocupa mult spatiu, sunt scumpe si foarte complexe, necesitand personal special pregatit pentru utilizarea lor. Aceste lucruri motiveaza cercetarea sa foloseasca tehnologii de microfabricatie si microfluidica pentru obtinerea unor astfel de citometre inovative de dimensiuni reduse, ieftine si simplu de utilizat. Principiul de functionare al unui citometru: celulele de interes sunt marcate cu anticorpi sau cu etichete magnetice sau fluorescente. Apoi aceste celule sunt lasate sa curga in linie, una cate una, prin zona de detectie. Principalul dezavantaj al acestei metode este reprezentat de metodele de focalizare a celulelor pe o zona ingusta, astfel incat sa permita studierea lor individuala. Se pot folosi diferite metode, cum ar fi focalizarea hidrodinamica, electrocinetica sau dielectroforetica, fiecare din acestea fiind dificil de controlat.

Filtrarea este o alta tehnologie conventionala care a fost miniaturizata cu succes. Filtrele la scara microscopica functioneaza pe acelasi principiu ca si cele la scara macroscopica, adica separa celule in functie de dimensiune. Folosind microfabricatie se pot obtine matrici de piloni, filtre interdigitate sau membrane pentru filtrarea mecanica a mostrelor heterogene. Un avantaj al microfiltrarii este ca nu necesita solutie tampon specifica. Totusi, fabricarea acestor filtre nu este simpla. In plus, captarea celulelor nu este reversibila, iar de multe ori are loc infundarea filtrului si cresterea presiunii in interiorul filtrului, in special in timpul operatiilor de lunga durata sau cu mostre de volume mari. Totusi aceasta tehnica nu prezinta o specificitate de filtrare prea buna.

Electroforeza si dielectroforeza sunt folosite pentru a separa specii celulare in microdispozitive. Fenomenul de electroforeza apare la interactia dintre sarcina electrica a celulei in timp ce dielectroforeza apare datorita polarizabilitatii celulei. Ambele tehnici pot fi folosite pentru a separa celulele in functie de proprietatile lor. Avantajul principal al folosirii fortelor electrice este ca tehnicile de fabricatie sunt standard si bine cunoscute, astfel permitand un control foarte bun la costuri foarte mici.

Campurile magnetice (magnetocuasistatice) sunt folosite pentru a manipula celulele folosind magnetizabilitatea intrinseca a acestora (de exemplu globulele rosii, care contin fier). Magnetoforeza are ca principal avantaj specificitatea, deoarece marea majoritate a materialelor nu au un raspuns magnetic sesizabil. Aplicand un camp magnetic perpendicular pe directia de curgere, se creaza un gradient de camp magnetic in camera de reactie. Celulele magnetizabile sunt capturate in aceasta camera in timp ce alte celule sau particule ne-magnetice curg mai departe. De asemenea, tinand cont de faptul ca particule magnetice de diferite dimensiuni sunt deviate in camp magnetic, se poate folosi magnetoforeza pentru a devia particulele in timpul curgerii catre rezervoare separate.

Fortele ultrasonice reprezinta o metoda simpla si eficienta de separare sau concentrare a grupurilor mari de celule. In prezenta acestora, o celula poate sa exprime o forta acustica repulsica sau atractiva, in functie de proprietatile mecanice. Astfel, fortele ultrasonice pot fi folosite pentru a capta celulele sau pentru a le concentra intr-un microcanal.

Fortele optice au fost folosite cu succes inca din anii 70, si folosesc presiunea radiatiei unui laser pentru a capta si manipula o celula. Celula captata poate fi manipulata cu precizie intre diferite locatii. Totusi, desi tehnica este non-invaziva si foarte precisa, poate sa manipuleze un numar mic de celule in acelasi timp. Astfel pentru separarea populatiilor mari de celule caracteristice sangelui, timpul necesar este foarte lung. In acelasi timp, echipamentul necesar este foarte scump si dificil de utilizat.

Biochipul va fi alcatuit din mai multe module interschimbabile. Pentru faza experimentală a acestui proiect, abilitatea de a schimba rapid arhitectura biocipului sau de a inlocui anumite module ale biocipului in caz de de incompatibilitate, reprezinta un factor important de success. Astfel, avem posibilitatea de a studia modulele atat individual, cat si asamblate sub forma biocipului. In prima faza, biocipul va fi alcatuit din patru module cu functii distincte.

Avand in vedere ca dorim sa lucram cu mostre de sange ne-procesat, pentru a studia o anumita populatie de celule trebuie sa filtram mostrele. De

aceea, primele doua module sunt dedicate filtrarii si separarii diferitelor populatii de celule.

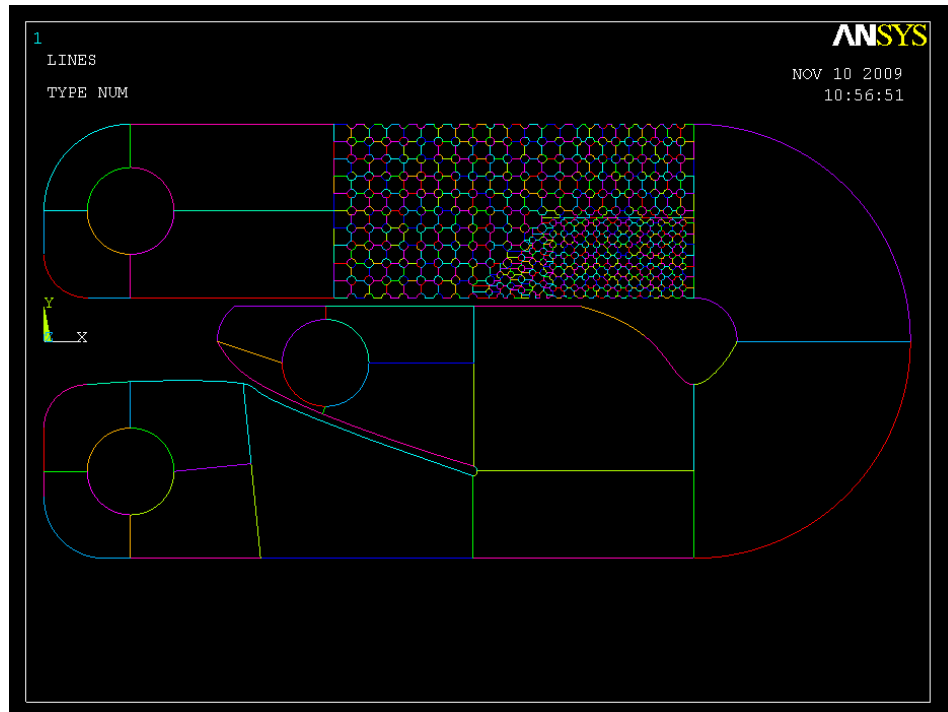


Figura 1: Schita primului modul de filtrare dupa dimensiunea celulelor. Intrarea fluidelor se face prin orificiul din partea de sus a dispozitivului, in timp ce prin orificiul median se colecteaza celule mici, iar prin orificiul inferior se colecteaza celule mari.

1.1.1. Filtrul pentru separarea celulelor de dimensiuni mici

Primul modul este un filtru dimensional (figura 1), destinat separarii celulelor de dimensiuni mici din sange. Dupa cum se observa in imagine, mostra de sange este introdusa in filtru prin orificiul din partea stanga sus. Apoi este fortat sa curga printr-o retea de piloni (figura 2), spatiul dintre acestia fiind variabil. Acestia vor face o prima distributie a celulelor in functie de dimensiuni. In prima parte, pilonii sunt asezati la distanta de $10\mu\text{m}$ unul fata de celalalt, si au rolul de a stabili frontul de curgere in timpul primei separari, apoi, in a doua parte, pilonii sunt distribuiti astfel incat se formeaza doua regiuni: o regiune cu distanta de separare intre piloni de $10\mu\text{m}$ si o regiune cu distanta de separare intre piloni de $5\mu\text{m}$. Din arhitectura retelei de piloni se poate observa directionare celulelor mari catre partea exterioara a filtrului. Bineinteles ca in timpul curgerii prin aceasta zona, celulele mici vor

trece aproape nestingherite, aceasta zona avand in special rolul de a directiona celulele mari catre zona lor de curgere. Componenta principala a filtrului este zona de curbura in care se va face cea mai mare parte a separarii. Datorita vitezei diferite de curgere a fluidului in zona de curbura, in general, particulele de dimensiuni mici se aranjeaza catre interiorul curburii in timp ce particulele de dimensiuni mari se aranjeaza catre exteriorul acesteia. Astfel se poate face o separare foarte buna a celulelor mari din sange (globule albe si rosii, inclusiv celule canceroase) de celulele de dimensiuni mici (de ex. trombocite). In aceasta zona se face practic separarea principala a celulelor mici de restul populatiilor de celule.

In final, in rezervorul din zona mediana a modulului se vor colecta celulele de dimensiuni mici iar in rezervorul inferior se vor colecta celulele de dimensiuni mari.

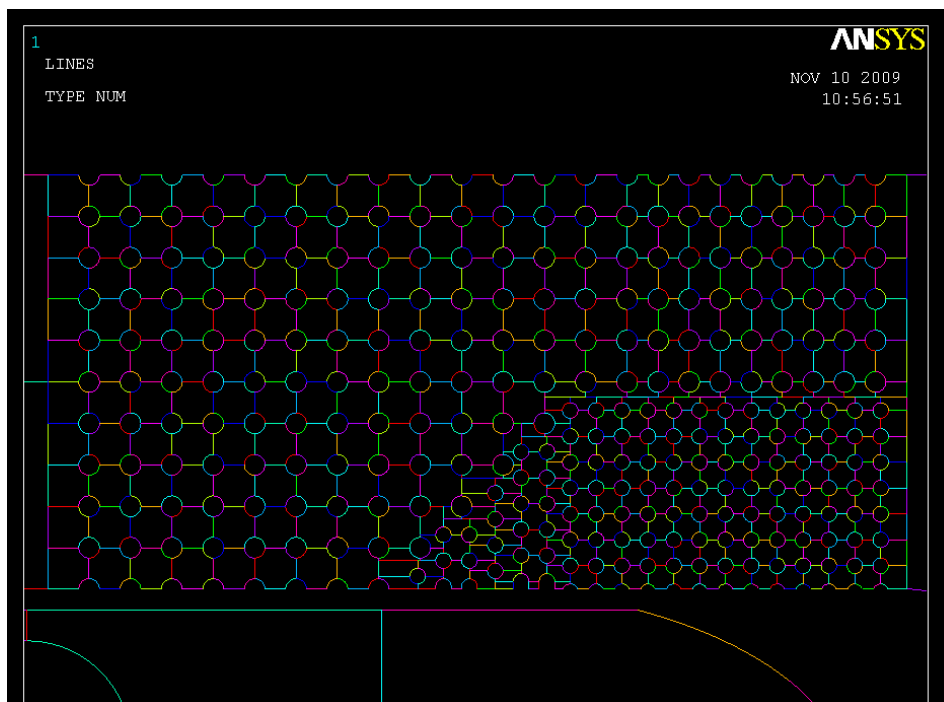


Figura 2: Detaliu cu rețeaua de piloni pentru orientarea celulelor mari

1.1.2. Filtru pentru separarea celulelor după motilitate

Al doilea modul este un filtru după motilitate (figura 3), menit să separe celulele canceroase de restul celulelor prezente în mostra colectată după trecerea prin primul filtru. Este bine cunoscut faptul că celulele bolnave

de cancer au motilitatea mult mai ridicata in comparatie cu restul celulelor. Astfel, desi toate celulele prezinta un anumit grad de motilitate al membranei, celulele canceroase se strecoara mult mai usor prin spatiile inguste datorita motilitatii mult mai ridicate.

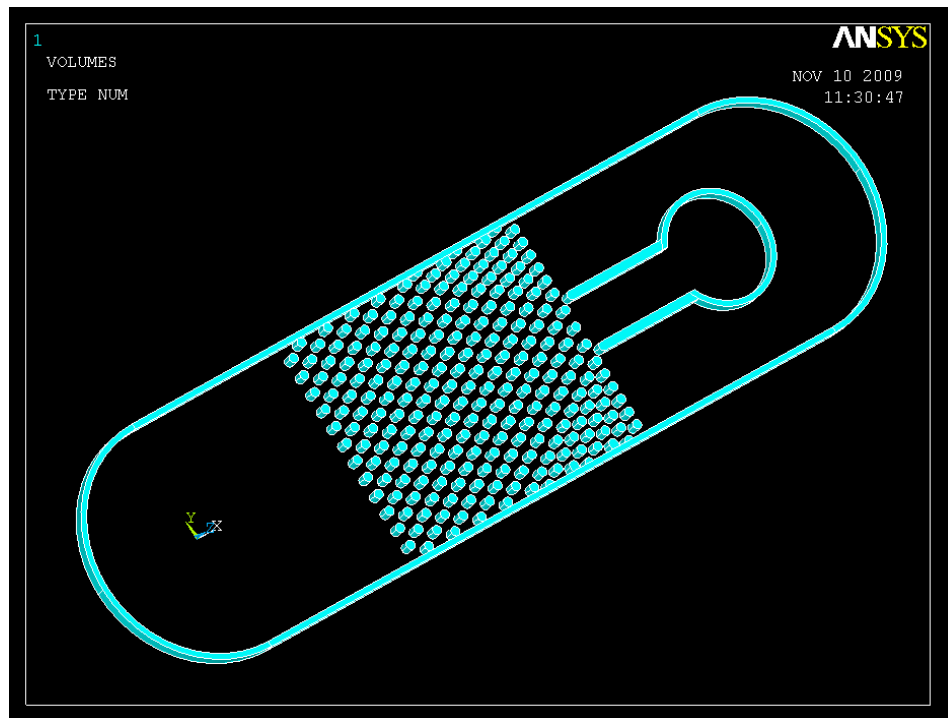


Figura 3: Schita celui de-al doilea filtru. Fluidul este introdus prin partea stanga a filtrului, iar separarea lor se face in zona centrala, in retea a de piloni. Celulele cu motilitate scazuta, impreuna cu o mica parte din celulele cu motilitate ridicata, sunt colectate prin orificiul central, in timp ce in orificiul din capatul filtrului vor fi colectate numai celule cu motilitate scazuta.

In cazul acestui filtru, celulele cu motilitate scazuta pot trece relativ usor printre piloni, dimensiunile lor fiind similare cu distanta dintre doi piloni consecutivi. In zona finala a retelei de piloni, acestea sunt directionate catre centrul filtrului si sunt colectate prin orificiul central. Celulele cu motilitate foarte ridicata vor putea sa treaca prin zonele laterale ale retelei de piloni, fiind colectate prin orificiul plasat la capatul filtrului. In mod evident, o parte din celulele cu motilitate ridicata vor trece impreuna cu celulele cu motilitate scazuta prin partea centrala a retelei de piloni si vor fi colectate prin orificiul central. Intr-adevar, filtrul nu are abilitatea de a face o separare excelenta a acestor celule, dar aceasta problema se rezolva in modulele ulterioare.

Celulele colectate in orificiul central vor trece in modulul magnetoforetic, iar celulele colectate in orificiul din capatul filtrului vor trece in modulul dielectroforetic.

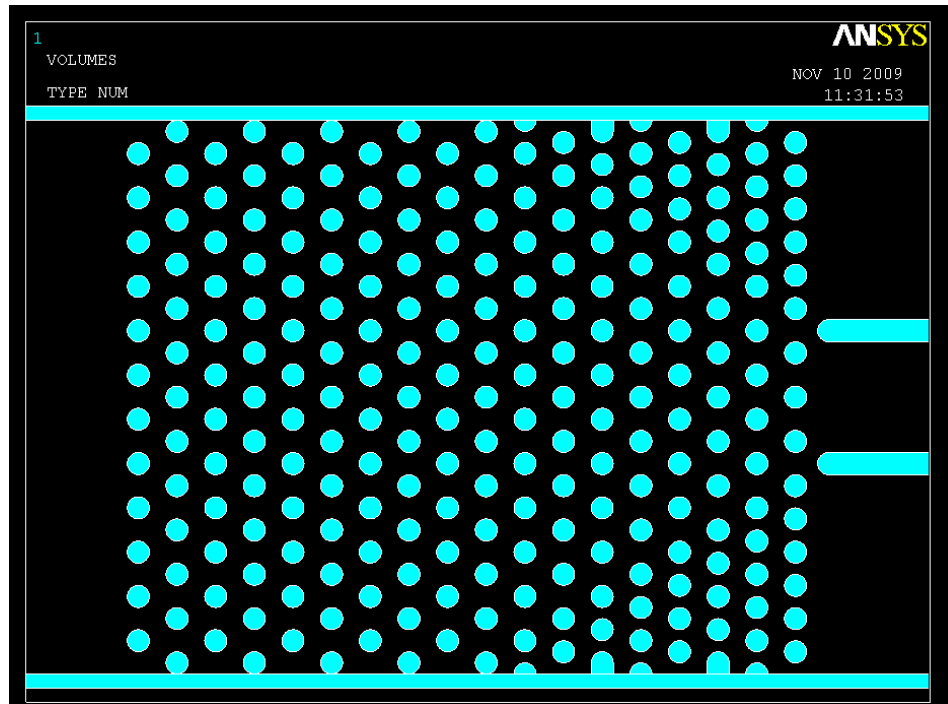


Figura 4: Detaliu cu rețeaua de piloni și geometria de direcționare a celulelor

1.1.3. Modulul de separarea a celulelor prin magnetoforeza

Modulul magnetoforetic folosește fenomenul de magnetoforeza pentru a separa celulele mari. În mod normal, celulele care ajung în acest modul sunt globule roșii, globule albe și o parte din celulele tumorale.

Particulele care posedă o magnetizație $\vec{M}$ indusă sau permanentă se pot mișca într-un canal microfluidic prin aplicarea unui câmp magnetic neomogen de intensitate $\vec{H}$. Fata de răspunsul dielectric care este destul de mare pentru foarte multe materiale, astfel încât să permită apariția efectului dielectroforetic, răspunsul magnetic este adesea prea mic pentru majoritatea materialelor pentru a apărea fenomenul de magnetoforeza. De aceea, probele se prepară prin atasarea materialelor de studiat pe particule magnetice înainte de introducerea într-un dispozitiv magnetoforetic. Deși această caracteristică ar parea lipsită de importanță, reprezintă de fapt

puterea magnetoforezei, deoarece ea asigura un control deplin asupra oricarei parti a probei supusa magnetoforezei. In dispozitivele dielectroforetice (DEP), raspunsul dielectric puternic al ambelor tinte si particulelor auxiliare pot afecta functionalitatea dispozitivului si pot ingreuna buna functionare a dispozitivelor DEP. Sistemele de separare a particulelor magnetice care au micromagneti incorporati pe chip se numesc sisteme active, iar sistemele ale caror centri de captura sunt magnetizate cu ajutorul campurilor magnetice externe puternice se numesc pasive. Sistemele magnetoforetice pe care le studiem sunt hibride, adica au structuri magnetice interne si sunt si magnetizate din exterior, si se va face o demonstratie teoretica a eficientei acestor sisteme magnetoforetice integrate in canale microfluidice, cu aplicatii in captarea, separarea si studierea biomoleculelor. Magnetoforeza este miscarea unei particule neutre din punct de vedere electric intr-un mediu vascos sub actiunea unui gradient mare al campului magnetic. Viteza de deplasare a particulei in aceste conditii de camp se numeste mobilitate magnetoforetica.

Globulele sanguine pot fi considerate ca particule magnetice mici [8]. In sangele integral, globulele albe (leucocitele) sunt diamagnetice, iar globulele rosii (eritrocitele) pot fi paramagnetice sau diamagnetice, depinzand de oxigenarea hemoglobinei lor. Din acest motiv, ele se vor comporta diferit sub actiunea unui camp magnetic neuniform, globulele rosii fiind atrase de gradienti mari de camp, in timp ce globulele albe vor fi respinse de acesti gradienti.

Modulul magnetoforetic este un microcanal pe fundul caruia este depus material feromagnetic, iar in exteriorul modulului este plasat un magnet permanent. Stratul feromagnetic poate fi gravat sub diferite forme de structuri pentru a amplifica gradientii de camp magnetic.

Consideram un element feromagnetic de raza a plasat axial in lungul axei x , cum se prezinta in figura 3.5, cu particule magnetice curgand paralel cu elementul feromagnetic. Un camp magnetic extern uniform H_0 este aplicat normal pe axa elementului feromagnetic. In spatiul liber, conditiile magnetostatice pot fi exprimate ca

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad (3.33)$$

$$\nabla \times \vec{H} = 0 \quad (3.34)$$

unde $\vec{B}$ si $\vec{H}$ sunt inductia campului magnetic si respectiv intensitatea campului magnetic. Natura nerotationala a campului magnetic H permite definirea campului magnetic ca gradient al potentialului scalar magnetic Φ_m :

$$\vec{H} = -\nabla \Phi_m \quad (3.35)$$

Pornind de la ecutiile (3.33, 3.34) si ecuatia (3.35), putem obtine ecuatia Laplace a lui Φ_m , ca:

$$\nabla^2 \Phi_m = 0 \quad (3.36)$$

O solutie generala a ecuatiei Laplace independenta de x , in coordonate cilindrice cu un domeniu nerestrictiv pentru unghiul φ poate fi exprimata ca:

$$\Phi_{m_n} = r^n [\alpha_n \sin(n\varphi) + \beta_n \cos(n\varphi)] + r^{-n} [\alpha'_n \sin(n\varphi) + \beta'_n \cos(n\varphi)] \quad (3.37)$$

unde r si φ sunt coordonatele cilindrice, α_n , β_n , α'_n si β'_n sunt constante arbitrare, si n este un intreg pozitiv. Este folositor sa observam ca, regiunea de interes se intinde pe axa cilindrica unde $r=0$, termenii continand factorul r^{-n} nu pot exista. Pe de alta parte, daca regiunea de interes include un punct la infinit, termenii continand factorul r^n nu pot exista exceptie fiind pentru $n=1$, deoarece campul magnetic H este egal cu H_{ext} pentru $r \rightarrow \infty$. Sub influenta acestor doua conditii, ecuatia (3.37) poate fi rescrisa ca

$$\Phi_{m_n} = r^n [\alpha_n \sin(n\varphi) + \beta_n \cos(n\varphi)], r < a \quad (3.38a)$$

$$\Phi_{m_n} = r [\alpha'_1 \sin(\varphi) + \beta'_1 \cos(\varphi)] + r^{-n} [\alpha''_n \sin(n\varphi) + \beta''_n \cos(n\varphi)], r > a \quad (3.38b)$$

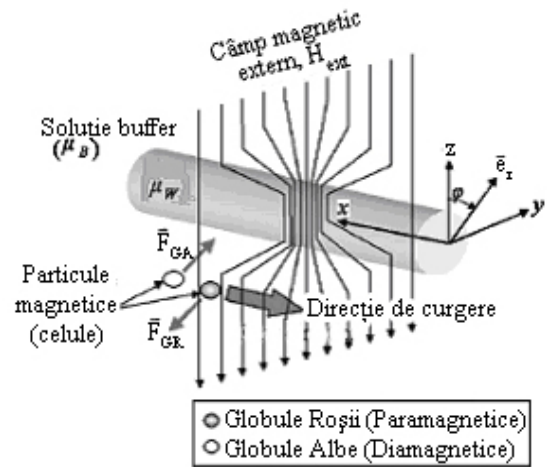


Fig. 3.5. Reprezentarea schematica a actiunii campului magnetic extern si a campului magnetic generat de un element feromagnetic situat intr-un canal microfluidic prin care curge o solutie buffer asupra globulelor sangvine rosii si albe

unde α_n'' si β_n'' sunt constante arbitrare

Pentru un element feromagnetic cu profil cilindric, potentialul magnetic va produce un gradient nenul in lungul axei x si un gradient zero in lungul axei y. Prin urmare, in ambele ecuatii (3.38a) si (3.38b) termenul $\sin(n\varphi)$ nu poate exista, si $n=1$ Ecuatiile (3.38a) si (3.38b) pot apoi fi exprimate ca

$$\Phi_m = r\beta_1' \cos \varphi, r < a \quad (3.39a)$$

$$\Phi_m = r\beta_1' \cos \varphi + \frac{1}{r}\beta_1'' \cos \varphi, r > a \quad (3.39b)$$

Utilizand o conditie de frontiera astfel incat campul magnetic $\vec{H}$ cand $r \rightarrow \infty$ sa fie $H_{ext}\vec{e}_z$, vom obtine:

$$\beta_1' = -H_{ext} \quad (3.40)$$

Pentru a afla constantele β_1 si β_1'' , conditiile de frontiera pentru un camp magnetostatic la $r = a$ sunt utilizate ca

$$B_n|_{r \rightarrow a-0} = B_n|_{r \rightarrow a+0} \quad (3.41a)$$

$$H_t|_{r \rightarrow a-0} = H_t|_{r \rightarrow a+0} \quad (3.41b)$$

unde $B_n|_{r \rightarrow a-0}$ si $H_t|_{r \rightarrow a-0}$ sunt componenta normala a inductiei campului magnetic si componenta tangentiala a intensitatii campului magnetic de la interfata cu elementul feromagnetic ($r = a-0$), iar $B_n|_{r \rightarrow a+0}$ si $H_t|_{r \rightarrow a+0}$ reprezinta componenta normala a inductiei campului magnetic si componenta tangentiala a intensitatii campului magnetic la interfata cu solutia buffer ($r = a+0$), respectiv Prin substituirea ecutiei (3.35), (3.39a), si (3.39b) in ecuatie (3.41a) si (3.41b), β_1 si β_1'' pot fi socotite ca

$$\beta_1 = \frac{-2\mu_B \cdot H_{ext}}{\mu_w + \mu_B} \quad (3.42)$$

$$\beta_1'' = ka^2 H_{ext} \text{ pentru } k = \frac{\mu_w - \mu_B}{\mu_w + \mu_B}, \quad (3.43)$$

unde μ_B si μ_w sunt permeabilitatile solutiei buffer si respectiv a elementului feromagnetic,

Prin utilizarea ecutiilor (3.40), (3.42), (3.43), si (3.39a), (3.39b) potentialul magnetic poate fi exprimat astfel:

$$\Phi_m = -r \frac{2\mu_B H_{ext}}{\mu_W + \mu_B} \cos \varphi, \quad r < a \quad (3.44a)$$

$$\Phi_m = -r H_{ext} \cos \varphi + \frac{1}{r} k a^2 H \cos \varphi, \quad r > a \quad (3.44b)$$

unde in ecuatie (3.44b) primul termen este afectat de campul magnetic extern, iar al doilea termen este afectat de campul magnetic generat de elementul feromagnetic plasat in canalul microfluidic.

Fora magnetica $\vec{F}_{BC}$ care actioneaza asupra globulei sanguine plasata in solutia buffer poate fi exprimata prin:

$$\vec{F}_{BC} = \frac{1}{2} \mu_0 \underbrace{(\chi_{BC} - \chi_B)}_{=\chi} \cdot v_{BC} \vec{\nabla} \left(\vec{H} \cdot \vec{H} \right) \quad (3.45)$$

unde χ_{BC} si χ_B sunt susceptibilitatile globulei sanguine si respectiv a solutiei buffer, iar v_{BC} este volumul ($= 4/3\pi b^3$) globulei sanguine de raza b .

Substituind ecuatie (3.35) si ecuatie (3.44b) in ecuatie (3.45), deducem forta magnetica exercitata asupra globulei sanguine ca fiind:

$$\vec{F}_{BC} = -\frac{2k\mu_0\chi \cdot v_{BC}a^2}{r^3} \left(k \frac{a^2}{r^2} + \cos 2\varphi \right) H_{ext}^2 \vec{e}_r - \frac{2k\mu_0\chi \cdot v_{BC}a^2}{r^3} H_{ext}^2 \sin 2\varphi \vec{e}_\varphi, \quad r > a$$

Din ecuatie (3.46), se observa ca, pentru particule magnetice plasate pe axa x ($\varphi \approx 0^\circ$ in figura 3.5), $\sin 2\varphi \approx 0^\circ$, $\cos 2\varphi \approx 1$, si elementul feromagnetic din microcanal atrage particule pentru care χ este pozitiv (adica particule paramagnetice), iar pentru particule magnetice plasate pe axa y ($\varphi \approx 90^\circ$ in figura 3.5) $\sin 2\varphi \approx 0^\circ$, $\cos 2\varphi \approx -1$, si elementul feromagnetic atrage particule pentru care χ este negativ (adica particule diamagnetice). Pentru a obtine o forta magnetica inalta [proportionala la patratul campului magnetic extern cum este data de catre ecuatie (3.46), microseparatorul magnetoforetic este proiectat pentru a utiliza modul de captura diamagnetic. De la modelul teoretic derivat de microseparator magnetoforetic, directia de

forța magnetică în jurul unui fir feromagnetic circular, în cadrul unui câmp magnetic extern uniform H_{ext} poate fi estimată (figura 3.6)

Figura 3.6 prezintă modul de captură diamagnetică a unei globule sangvine aflate în microcanalul în care curgerea are loc în direcția axei x , perpendicular pe câmpul magnetic extern (direcția axei z) și perpendicular pe forța exercitată asupra globulelor sangvine.

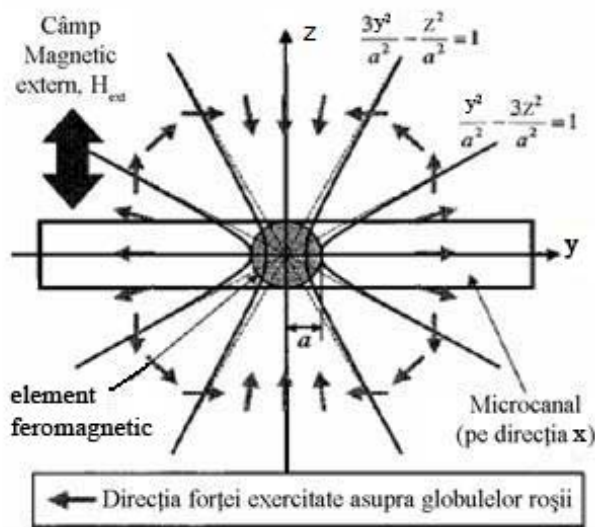


Fig. 3.6. Reprezentarea schematică a acțiunii câmpului magnetic extern și a celui generat de elementul feromagnetic plasat în canalul microfluidic asupra globulelor roșii paramagnetice

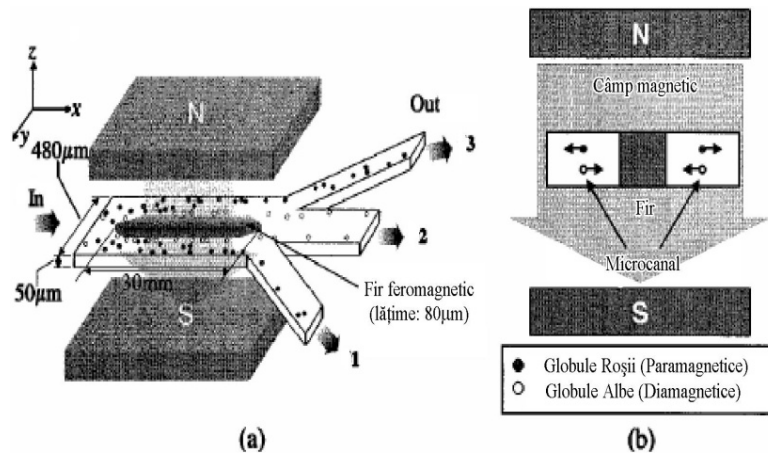


Fig. 3.7. Schema unui separator magnetoforetic a globulelor sangvine ce poate fi utilizat în sisteme lab-on-a-chip. (a) vedere în perspectivă; (b) vedere în secțiune transversală

Elementele feromagnetice sunt formate din trasee metalice feromagnetice de permalloy care formează o buclă de curent ce se încadrează într-un patrat de latură L , plasat în planul xy , centrul lui fiind originea axelor

de coordonate si paralel cu axa x si axa y (Fig.3.2). Presupunem curgerea curentului in sens trigonometric. Pornim din coltul stanga cel mai de jos si urmam directia curentului, din coltul notat cu (a) spre (b), (c), si (d). Vectorii de pozitie sunt:

$$\begin{aligned}
 \vec{r}_{ab} &= -\frac{L}{2}\vec{e}_y, & \vec{e}_{ab} &= \vec{e}_x \\
 \vec{r}_{bc} &= \frac{L}{2}\vec{e}_x, & \vec{e}_{bc} &= \vec{e}_y \\
 \vec{r}_{cd} &= \frac{L}{2}\vec{e}_y, & \vec{e}_{cd} &= -\vec{e}_x \\
 \vec{r}_{da} &= -\frac{L}{2}\vec{e}_x, & \vec{e}_{da} &= -\vec{e}_y
 \end{aligned} \tag{3.24}$$

Fora electromagnetica generata prin polarizarea elementului feromagnetic este data de relatia:

$$\vec{F}_m = I \cdot L \cdot (\vec{e}_L \times \vec{B}) \tag{3.25}$$

unde $\vec{e}_L$ este versor ce indica directia curentului, iar I este intensitatea curentului electric.

Momentul fortei electromagnetice generata de un element feromagnetic, $\vec{\tau}_m$, va fi:

$$\begin{aligned}
 \vec{\tau}_m &= I \cdot L \cdot \sum \vec{r}_i \times (\vec{e}_i \times \vec{B}) \\
 \vec{\tau}_m &= I \cdot L \cdot [\vec{r}_{ab} \times (\vec{e}_{ab} \times \vec{B}) + \vec{r}_{bc} \times (\vec{e}_{bc} \times \vec{B}) + \vec{r}_{cd} \times (\vec{e}_{cd} \times \vec{B}) + \vec{r}_{da} \times (\vec{e}_{da} \times \vec{B})] \\
 \vec{\tau}_m &= I \cdot L \cdot \frac{L}{2} \cdot [-\vec{e}_y \times (\vec{e}_x \times \vec{B}) + \vec{e}_x \times (\vec{e}_y \times \vec{B}) - \vec{e}_y \times (\vec{e}_x \times \vec{B}) + \vec{e}_x \times (\vec{e}_y \times \vec{B})] \\
 \vec{\tau}_m &= I \cdot \frac{L^2}{2} \cdot [-\vec{e}_y \cdot \vec{B} \cdot \vec{e}_x + \vec{e}_y \vec{e}_x \vec{B} + \vec{e}_x \cdot \vec{B} \cdot \vec{e}_y - \vec{e}_x \vec{e}_y \vec{B} - \vec{e}_y \cdot \vec{B} \cdot \vec{e}_x + \vec{e}_y \vec{e}_x \vec{B} + \vec{e}_x \cdot \vec{B} \cdot \vec{e}_y - \vec{e}_x \vec{e}_y \vec{B}] \\
 \vec{\tau}_m &= I \cdot \frac{A}{2} \cdot [2\vec{e}_x \cdot \vec{B} \cdot \vec{e}_y - 2\vec{e}_y \cdot \vec{B} \cdot \vec{e}_x] \\
 \vec{\tau}_m &= I \cdot A \cdot [\vec{e}_x \cdot \vec{B} \cdot \vec{e}_y - \vec{e}_y \cdot \vec{B} \cdot \vec{e}_x] = I \cdot A \cdot (B_x \vec{e}_y - B_y \vec{e}_x)
 \end{aligned}$$

$$\vec{\tau}_m = I \cdot A \cdot \vec{R} \times \vec{B} = \vec{m} \times \vec{B} \tag{3.26}$$

1.1.4. Dispozitivul de separare prin dielectroforeza

Modulul dielectroforetic folosește fenomenul de dielectroforeza pentru a capta diferite tipuri de celule. Celulele care ajung în acest modul sunt celule canceroase. Scopul este acela de a capta aceste celule pentru studierea acestora.

Dielectroforeza este fenomenul datorită căruia o forță este exercitată asupra unei particule dielectrice atunci când se află într-un câmp electric neuniform. Pentru ca această forță să apară, nu este necesar ca particulele să fie încărcate electric. Toate tipurile de particule prezintă proprietăți dielectrice în prezența câmpurilor electrice, dar valoarea forței depinde puternic de frecvența câmpului electric, de mediul în care se află particulele, de proprietățile electrice, forma și dimensiunea particulelor. În consecință, câmpuri electrice cu o anumită frecvență sunt capabile să manipuleze anumite particule cu o selectivitate foarte bună. Acest aspect poate permite separarea celulelor sau orientarea și manipularea nanoparticulelor sau a nanofirelor.

Studiile legate de dielectroforeză au început în anii '50, când Herbert Pohl a publicat primele lucrări despre acest fenomen^[1,2]. Pohl a și definit fenomenul ca fiind mișcarea de translație a materiei neutre prin efectele de polarizare ale câmpului electric neuniform^[3]. În trecut, dielectroforeza era studiată în special pentru filtrarea fluidelor. În ziua de azi, odată cu apariția și îmbunătățirea tehnologiilor bazate pe MEMS, se studiază intens folosirea dielectroforezei pentru separarea și manipularea celulelor, microparticulelor sau a nanoparticulelor.

Principalele caracteristici ale dielectroforezei sunt:

- acțiunea forței dielectroforetice poate fi observată numai dacă particulele sunt plasate în câmp electric neuniform;
- forța dielectroforetică nu depinde de polaritatea câmpului, deci poate fi observată atât în câmp electric alternativ cât și continuu;
- atunci când permitivitatea mediului este mai mică decât permitivitatea particulelor, acestea vor fi atrase de regiunile de câmp electric puternic;

- în cazul în care permitivitatea mediului este mai mare decât permitivitatea particulelor, acestea vor fi atrase de regiunile de câmp electric slab;
- fenomenul dielectroforetic se observă ușor pentru particule cu dimensiuni între $1\mu\text{m}$ și $1000\mu\text{m}$. Pentru particulele mai mari de 1mm , gravitația, iar pentru particulele mai mici de $1\mu\text{m}$ mișcarea Browniană, joacă roluri importante fiind mult mai puternice decât forța dielectroforetică.

Cele două fenomene asociate cu dielectroforeza sunt electrorotația și dielectroforeza cu undă călătoare.

Cercetarea și dezvoltarea laboratoarelor pe un cip (LOC) și microsistemelor de analiză totală (μTAS) au căpătat un avânt impresionant în ultimii ani datorită potențialului acestora de a genera analize de calitate, rapide și ieftine pentru o gamă largă de aplicații^[4]. În special în biomedicină, se dezvoltă sisteme folosind aceste tehnologii pentru a: izola celule specifice de interes, amplifica informația obținută din mostre foarte mici și pentru a măsura cu acuratețe indicatorii celulari. Dielectroforeza este o metodă nouă studiată intens. Folosind un câmp electric alternativ de radio-frecvență, celulele pot fi controlate selectiv datorită proprietăților native ale acestora^[5]. Polarizabilitatea intramembranară, diferită pentru fiecare tip de celule, le face să răspundă într-un mod unic la frecvențe specifice. Celulele cu similitudini geometrice sau genetice pot avea răspunsuri similare, dar totuși distincte, la frecvențe date. În funcție de proprietățile celulelor, acestea se pot mișca sub acțiunea forței dielectroforetice către gradienti de câmp electric mari sau mici.

Dielectroforeza trebuie luată în calcul ca o metodă alternativă pentru concentrarea sau separarea precum și pentru centrifugare, filtrare, sortare prin fluorescență sau pensete optice. Deoarece dielectroforeza poate acționa direct asupra celulelor, fără să fie necesară marcarea acestora, scurtează mult timpul de procesare, care altfel ar fi fost necesar pentru marcarea, etichetarea și apoi validarea acestor operații. Dielectroforeza permite izolarea și analiza unei game vaste de particule, celule, bacterii, virusuri, ADN sau proteine, folosind aceeași procedură^[6-7].

De asemenea, un avantaj enorm al dielectroforezei față de metodele concurente, este acela că, după captarea selectivă celulele rămân viabile

pentru analize și studii ulterioare. Se pot colecta parametri multipli ai celulelor vii, și, dacă este necesar, celule specifice pot fi colectate^[8]. Folosirea semnalelor electronice permite automatizarea sistemului dielectroforetic.

Deși cel mai important aspect al multor aplicații biomedicale necesită izolarea selectivă a celulelor fără a fi vătămate, anumite procese necesită distrugerea celulelor selectate. Se pare că acest lucru poate fi obținut cu ajutorul dielectroforezei, deși momentan există multe limitări ale tehnologiei.

În concluzie, tehnologiile bazate pe dielectroforeză reprezintă o unealtă atractivă cu multe aplicații posibile pentru separarea, manipularea și caracterizarea celulelor. Totuși, încă se studiază intens aceste aplicații, dar și interconectarea dispozitivelor dielectroforetice cu alte sisteme microfluidice pentru obținerea unui LOC sau μ TAS.

Forța dielectroforetică poate fi folosită pentru captarea particulelor dielectroforetice aflate în suspensie în interiorul canalelor microfluidice. Dacă se crează un câmp electric neomogen prin aplicarea unor potențiale pe electrozi fabricați în interiorul microcanalului, particulele dielectrice aflate în suspensie vor fi atrase de acești electrozi, iar dacă forța dielectroforetică ce le atrage este mai mare decât forța vâscoasă de deplasare, atunci particulele vor rămâne captate în apropierea electrozilor^[9].

Să considerăm un canal microfluidic de lungime L , lățime w și înălțime h , cu înălțimea mult mai mică decât lățimea. Acesta poate fi aproximat printr-un canal format de doi pereți plani-paraleli infiniți pe direcția lățimii. Se consideră sistemul de coordonate în centrul fundului microcanalului, astfel încât: $-L/2 < x < L/2$, $-w/2 < y < w/2$ și $0 < z < h$. Prin aplicarea unei diferențe de presiune de-a lungul canalului se obține curgerea fluidului cu profilul vitezelor de forma $\vec{v} = v_x(z)\vec{e}_x$:

$$v_x(z) = \frac{\Delta p}{2\eta L} (h-z)z = 6 \left(1 - \frac{z}{h}\right) \frac{z}{h} v_0 \quad 2.23$$

unde v_0 este viteza medie de curgere, astfel încât debitul este $Q = v_0 wh$.

Particulele dielectrice aflate în suspensie în fluid au raza a . Neglijând interacțiile cu pereții canalului putem aproxima forța vâscoasă care acționează asupra sferelor captate la distanța r :

$$\vec{F}_{\text{vasc}} \approx 6\pi\eta a \vec{v}(\vec{r}) \quad 2.24$$

Câmpul electric neomogen este creat prin aplicarea unui potențial $\Phi = \Delta V$ pe un electrod metalic de rază r_0 situat pe fundul canalului la distanța $r=0$ și altui potențial $\Phi=0$ pe un electrod metalic planar care acoperă tavanul canalului pe planul $\vec{r} = h\vec{e}_z$. Se consideră ca fluidul are conductivitate atenuată astfel încât în jurul electrozilor nu se formează zone Debye care să ecraneze electrozii. Astfel se poate calcula potențialul $\Phi(\vec{r})$ creat în punctul unde particula este captată:

$$\Phi(\vec{r}) = \frac{r_0}{\vec{r}} \Delta V - \frac{r_0}{|\vec{r} - 2h\vec{e}_z|} \Delta V \quad 2.25$$

În mod evident captarea particulelor are loc în zona electrodului sferic. În această zonă, intensitatea câmpului electric este dată de relația:

$$\vec{E}(\vec{r}) = -\nabla\Phi(\vec{r}) \approx \frac{r_0\Delta V}{r^2} \vec{e}_r, \text{ pentru } r_0 < |\vec{r}| \ll h \quad 2.26$$

unde $\vec{e}_r$ este vectorul radial cu sensul în direcția opusă electrodului sferic.

Având ecuația intensității câmpului electric 2.26, putem ușor să o derivăm pentru a obține expresia forței dielectroforetice:

$$\vec{F}_{\text{dep}}(\vec{r}) = 2\pi\epsilon_1 \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} a^3 \nabla \left[\frac{(\Delta V)^2 r_0^2}{r^4} \right] = -8\pi \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} \frac{a^3 r_0}{r^5} \epsilon_1 (\Delta V)^2 \vec{e}_r \quad 2.28$$

Maximul forței dielectroforetice este atins atunci când particula este la distanță minimă față de electrod, adică $r_0 = r_{\text{min}} = r_0 + a$. Notând raza electrodului cu $r_0 = \Gamma a$ obținem distanța minimă de forma:

$$r_{\text{min}} = (1 + \Gamma)a \Rightarrow \Gamma \equiv \frac{r_0}{a} \quad 2.29$$

De aici putem calcula forța dielectroforetică maximă:

$$F_{\text{dep}}^{\text{max}} = |\vec{F}_{\text{dep}}(r_{\text{min}})| = 8\pi \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} \frac{\Gamma^2}{(1 + \Gamma)^5} \epsilon_1 (\Delta V)^2 \quad 2.30$$

Viteza medie de curgere a fluidului în punctul $z = r_0 + a = (1 + \Gamma)a$ rezultă din ecuația 2.23:

$$v_x(r_0 + a) = 6 \left(1 - (1 + \Gamma) \frac{a}{h} \right) (1 + \Gamma) \frac{a}{h} v_0 \approx 6(1 + \Gamma) \frac{a}{h} v_0 \quad 2.31$$

Pentru ca particulele să fie captate de electrozii sferici, este necesar ca factorul Clausius-Mossotti să fie pozitivă, deci ca fluidul să aibă constanta dielectrică mai mică decât a particulelor ce vor fi captate.

Folosirea unui câmp electric alternativ oferă mai multe avantaje:

- sarcinile electrice din fluid (ionii) nu își schimbă poziția medie sub influența câmpului;
- nu mai există riscul formării zonei de ecranare Debye;
- efectul dielectroforetic se face simțit chiar dacă fluidul și particulele sunt conductive;
- factorul Clausius-Mossotti depinde de frecvența câmpului, permițând astfel controlul deplasării particulelor prin schimbarea frecvenței.

În acest caz, potențialul electric și intensitatea câmpului electric sunt de forma:

$$\Phi(\vec{r}, t) = \Phi(\vec{r}) e^{-e \omega t} \quad 2.32a$$

$$E(\vec{r}, t) = E(\vec{r}) e^{-e \omega t} \quad 2.32b$$

Condiția la limită a suprafeței sferei pentru componenta radială $E_r(r, \theta) = -\partial_r \Phi(a, \theta)$ este:

$$\varepsilon_1 E_{r,1}(a, \theta, t) - \varepsilon_2 E_{r,2}(a, \theta, t) = q \quad 2.33$$

unde q este sarcina de pe suprafața sferei.

În general, sferele nefiind conductive, sarcina de suprafață este zero. Dar în cazul câmpului electric alternativ, sferele pot fi conductive, deci sarcina de suprafață va fi diferită de zero și va fi variabilă în timp. Derivata sarcinii electrice în funcție de timp este dată de legile de conservare și de legea Ohm:

$$\partial_t q(t) = J_{r,1}(a, \theta, t) - J_{r,2}(a, \theta, t) = \sigma_{el,1} E_{r,1}(a, \theta, t) - \sigma_{el,2} E_{r,2}(a, \theta, t) \quad 2.34$$

Luând în considerare derivata ecuației 2.33 și intensitatea câmpului electric de forma 2.32b și înlocuind în ecuația 2.34 ajungem la:

$$\left(\varepsilon_1 - i \frac{\sigma_{el,1}}{\omega} \right) E_{r,1}(a, \theta) = \left(\varepsilon_2 - i \frac{\sigma_{el,2}}{\omega} \right) E_{r,2}(a, \theta) \quad 2.35$$

Se poate defini funcția complexă dielectrică $e(\omega)$ ca fiind:

$$e(\omega) = \varepsilon - i \frac{\sigma}{\omega} \quad 2.36$$

Deci condiția la limită în cazul câmpului electric alternativ are aceeași expresie matematică cu cazul câmpului electric continuu, deci se pot folosi direct rezultatele ecuației 2.22 folosind funcțiile dielectrice complexe în factorul Clausius-Mossotti:

$$\vec{F}_{dep}(\vec{r}_0, t) = 2\pi\varepsilon_1 \frac{\varepsilon_2(\omega) - \varepsilon_1(\omega)}{\varepsilon_2(\omega) + 2\varepsilon_1(\omega)} a^3 \nabla [\vec{E}(\vec{r}_0, t)^2] \quad 2.37$$

Deci, media temporară reală a forței dielectroforetice pentru rezultatul complex obținut în 2.37 este:

$$\langle \vec{F}_{dep}(\vec{r}_0, \omega) \rangle = 2\pi\varepsilon_1 \operatorname{Re} \left[\frac{\varepsilon_2(\omega) - \varepsilon_1(\omega)}{\varepsilon_2(\omega) + 2\varepsilon_1(\omega)} \right] a^3 \nabla [\vec{E}_{rpm}(\vec{r}_0, t)^2] \quad 2.38$$

unde $\vec{E}_{rpm} = \vec{E}/\sqrt{2}$ este rădăcina pătrată medie.

Un element important este și frecvența critică la care se schimbă semnul pentru $\langle \vec{F}_{dep}(\vec{r}_0, \omega) \rangle$. Această frecvență critică se obține din factorul Clausius-Mossotti dacă $\operatorname{Re} \left\{ \left[\varepsilon_2(\omega_c) - \varepsilon_1(\omega_c) \right] \left[\varepsilon_2(\omega_c) + 2\varepsilon_1(\omega_c) \right]^* \right\} = 0$ ceea ce rezultă:

$$\omega_c = \sqrt{\frac{(\sigma_{el,1} - \sigma_{el,2})(\sigma_{el,2} + 2\sigma_{el,1})}{(\varepsilon_2 - \varepsilon_1)(\varepsilon_2 + 2\varepsilon_1)}} \quad 2.39$$

Forța dielectroforetică dependentă de frecvență poate fi folosită cu succes pentru separarea celulelor. Diferite tipuri de celule au proprietăți electrice diferite, deci au frecvențe critice diferite, astfel putându-se determina la ce frecvențe sunt atrase unele, celelalte fiind respinse.

1.2. CONCLUZII

În cadrul acestui capitol au fost stabilite componentele și arhitectura sistemului microfluidic pentru determinarea proprietăților reologice ale fluidelor biologice. Biochipul este gândit să fie alcătuit din mai multe module

interschimbabile. Pentru faza experimentală a acestui proiect, abilitatea de a schimba rapid arhitectura biocipului sau de a înlocui anumite module ale biocipului în caz de incompatibilitate, reprezintă un factor important de succes. Astfel, avem posibilitatea de a studia modulele atât individual, cât și a unui ansamblu de celular. Biocipul va conține sisteme de microcanale cu rezervoare și va fi alcătuit din patru module cu funcții distincte: filtru pentru separarea particulelor după dimensiuni, filtru pentru separarea particulelor după motilitate, modul dielectroforetic și modul magnetoforetic.

Componenta principală a modulului de filtrare este zona de curbura în care se va face cea mai mare parte a separării. Datorită vitezei diferite de curgere a fluidului în zona de curbura, în general, particulele de dimensiuni mici se aranjează către interiorul curburii în timp ce particulele de dimensiuni mari se aranjează către exteriorul acesteia. Astfel se poate face o separare foarte bună a celulelor mari din sânge (globule albe și roșii, inclusiv celule tumorale) de celulele de dimensiuni mici (de ex. trombocite). În această zonă se face practic separarea principală a celulelor mici de restul populațiilor de celule. În final, în rezervorul din zonă mediană a modulului se vor colecta celulele de dimensiuni mici iar în rezervorul inferior se vor colecta celulele de dimensiuni mari. Celulele colectate în orificiul central vor trece în modulul magnetoforetic, iar celulele colectate în orificiul din capătul filtrului vor trece în modulul dielectroforetic.

Modulul magnetoforetic este hibrid, adică are nanostructuri magnetice interne, care sunt magnetizate și din exterior, este integrat în canale microfluidice, cu aplicații în captarea, separarea și studierea biomoleculelor. Magnetoforeza va fi folosită atât pentru separarea celulelor marcate magnetic, cât și separarea după susceptibilitatea magnetică intrinsecă a celulelor. În sângele integral, globulele albe (leucocitele) sunt diamagnetice, iar globulele roșii (eritrocitele) pot fi paramagnetice sau diamagnetice, în funcție de oxigenarea hemoglobinei lor. Din acest motiv, ele se vor comporta diferit sub acțiunea unui câmp magnetic neuniform, globulele roșii fiind atrase de gradienti mari de câmp, în timp ce globulele albe vor fi respinse de acești gradienti.

Prin dielectroforeza se vor evidentia proprietatile unitatii celula – mediu, adica dimensiunea si forma celulei si proprietatile electrice atat ale celulei cat si ale mediului. Sistemul de microcanale se foloseste pentru separarea si sortarea celulelor din fluide biologice pentru imobilizarea celor specifice. Se atribuie dimensiunilor unei anumite celule o diferenta de potential masurata in timp ce celula se deplaseaza individual printr-o deschidere mica. Folosind modificarea impedantei in circuit la trecerea celulelor printr-o deschidere mica, se va dezvolta un nou sistem dielectroforetic pentru modelarea transportului molecular in fluide biologice.

1.3. REZULTATE

Proiect preliminar al componentelor si arhitecturii biochipului. Au fost proiectate urmatoarele module ale biochipului: filtrul de separare a celulelor dupa dimensiune, filtrul de separare dupa motilitate, modulul de separare magnetoforetica si modulul de separare dielectroforetica.