

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده برق و رباتیک

پایان نامه کارشناسی ارشد مهندسی برق افزاره‌های میکرو و نانوالکترونیک

# طراحی و ساخت سامانه میکروفلوئیدیک تشخیص سلول سرطانی مبتنی بر امیدانس فلوسایتومتری

نگارنده: علیرضا علاقه‌مند شندی

استاد راهنما

دکتر علی فتاح

مهر ۱۴۰۰

ضمن تقدیر و سپاس بی کران از پدر و مادر عزیزم که هیچ زمان نمی توانم جبران محبت ایشان را بکنم

این پژوهش را با کمال احترام و افتخار تقدیم

می نمایم به

قطب عالم امکان حضرت امام زمان (ع)، آیت رب و دود و ناجی ملک

وجود، آنکه جهان در انتظار عدالت و لطف اوست

به امید آنکه این اثر ناچیز زمینه ساز ظهور آن حضرت باشد

اکنون که بیاری پرودگار و راهبانی های استید بزرگ موفق به پایان رساندن این پژوهش شده ام و وظیفه خود آنست نهایت

پاس گزاری را از تمامی عزیزانی که در این راه به بنده کمک کرده اند به عمل آورم:

در آغاز از استاد عزیز و کراتقدر جناب آقای دکتر علی قلیچ که راهبانی این پژوهش را به عهده داشتند و در کمال سع صدر

بنده را از راهبانی ایشان بی نصیب نگذاشتند کمال تشکر و قدردانی را دارم

از جناب آقای دکتر حمید رضا حبیان که با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کجی در این عرصه بر من دریغ ننمودند کمال تشکر

و قدردانی را دارم

در آخر لازم می دانم از جناب آقای دکتر ولی ورمزیاری از دوستان خوب و صمیمی، که با صبر شکیبایی و نثار وقت پر

ارزششان مرا همراهی کردند که اگر از خود گذشتگی ایشان نبود این پژوهش به تمام نمی رسید کمال تشکر و قدردانی را دارم

اینجانب **علیرضا علاقه‌مند شندی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته برق افزارهای میکرو و نانو الکترونیک دانشکده برق و رباتیک دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان‌نامه طراحی و ساخت سامانه میکروفلوئیدیک تشخیص سلول سرطانی مبتنی بر امیدانس فلوسایتومتری تحت راهنمایی **دکتر علی فتاح** متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

## تاریخ

### امضای دانشجو

#### مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود . استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

## چکیده

گردش سلول‌های توموری یک نشانگر مهم برای انواع مختلف سرطان است. سلول‌های توموری گردشی در جریان خون بسیار نادر هستند تجزیه و تحلیل دقیق و جداسازی سلول‌های توموری گردشی یک کار چالش برانگیز است. یکی از روش‌های شناسایی سلول‌های توموری جداسازی آن‌ها از دیگر اجزای خون است در قسمت شبیه‌سازی با استفاده از نرم افزار کامسول و با بهره‌گیری از ترکیب نیروی دی-الکتروفورسیس و نیروی گریز از مرکز سعی بر جداسازی سلول‌های توموری در گردش شده‌است. در این شبیه‌سازی با ایجاد حالت دندان‌های مربعی شکل در کانال اصلی نیروی گریز از مرکز و با اعمال ولتاژ مستقیم ۵ ولت میدان الکتریکی مورد نیاز نیروی دی الکتروفورسیس ایجاد می‌شود. ذرات با سرعت ۱۲ میکرومتر بر ثانیه وارد قسمت میکسر می‌شوند و تحت تاثیر نیروی گریز از مرکز به اندازه ۰/۰۲۷ نیوتون قرار می‌گیرند در ادامه ذرات وارد کانال اصلی می‌شوند و با تاثیر پذیری از نیروی دی الکتروفورسیس به اندازه ۰/۵ نیوتون بر اساس اندازه شعاع جداسازی انجام می‌شود بازده در این روش برای سلول‌های سرطانی ۹۹ درصد می‌باشد. با استفاده از اختلاف مقاومت بین سلول سرطانی و محلول بافری با روش امیدانس فلوسایتومتری به شناسایی سلول سرطانی پرداخته شده‌است، مقاومت سلول‌های سرطانی بیشتر از محلول بافر می‌باشد و جریان عبوری از سلول‌های سرطانی کمتر از محلول بافر است در نتیجه با محاسبه میزان مقاومت الکتریکی به شناسایی هر سلول سرطانی می‌رسیم. در این پژوهش سیستمی را طراحی کردیم که می‌تواند امیدانس سلول‌ها را یکباره و با سرعت زیاد جهت شناسایی سلول‌های سرطانی اندازه‌گیری کند. ریز تراشه از شیشه و الکترودهایی از جنس تیتانیوم و نیکل و کانال میکروسیال از پلیمر PDMS ساخته شده‌است، میکرو کانال دارای عمق ۲۰ میکرومتر است و الکترودها با ابعاد ۲۰ میکرومتر از همدیگر جدا شده‌اند. آزمایش بر روی میکروفلوئیدیک جهت شناسایی سلول‌های سرطانی گردشی از ۱۰ میلی لیتر مایع بافر PBS مخلوط با ۴ عدد سلول سرطانی در مدت زمان ۱۰ ثانیه انجام می‌شود. سلول‌های سرطانی سینه به صورت کشت شده از آزمایشگاه‌های ژنتیک تهیه و در ۱۰ میلی لیتر محلول PBS با PH ۶/۸ مخلوط گردید است و در آخر میزان بازدهی شناسایی سلول سرطانی ۱۰۰ درصد بوده است.

**کلمات کلیدی: جداسازی سلول سرطانی، شناسایی سلول سرطانی، امیدانس فلوسایتومتری، دی الکتروفورسیس، کامسول**

## لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

- 1- Perfect separation of MCF-7 cancer cells from WBCs using both centrifugal force and di-electrophoresis

## فهرست مطالب

ک	فهرست جداول
ل	فهرست اشکال
س	فهرست علائم
۱	فصل یکم: مقدمه
۲	۱-۱ مقدمه .....
۳	۲-۱ چالش‌های پژوهش .....
۴	۳-۱ اهمیت و کاربرد موضوع .....
۴	۴-۱ اهداف این پژوهش .....
۴	۵-۱ ساختار پایان نامه .....
۷	فصل دوم: مفاهیم پایه تحقیق
۷	۱-۲ مقدمه .....
۷	۲-۲ سرطان .....
۷	۱-۲-۲ انواع سرطان .....
۸	۲-۲-۲ سرطان ریه .....
۸	۳-۲-۲ سرطان سینه .....
۸	۴-۲-۲ سرطان روده بزرگ .....
۸	۵-۲-۲ سرطان پوست .....
۹	۳-۲ خون .....
۹	۱-۳-۲ نشانگر زیستی .....
۱۰	۴-۲ نشانگرهای زیستی سرطان .....

- ۱-۴-۲ سلولهای توموری گردش اسید دئوکسی نوکلئیک (ct DNA) ..... ۱۰
- ۲-۴-۲ سلولهای آزاد اسید دئوکسی نوکلئیک (cf DNA) ..... ۱۱
- ۳-۴-۲ سلولهای بنیادی سرطانی (CSC) ..... ۱۲
- ۴-۴-۲ سلولهای توموری در گردش (CTC) ..... ۱۳
- ۵-۲ شناسایی سلولهای توموری در گردش ..... ۱۵
- ۶-۲ میکروفلوئیدیک ..... ۱۶
- ۱-۶-۲ نانو مواد ..... ۱۶
- ۲-۶-۲ میکرو مواد ..... ۱۷
- ۳-۶-۲ میکروفلوئیدیک فعال و غیر فعال ..... ۱۸
- ۴-۶-۲ کاربرد میکروفلوئیدیک ..... ۱۸
- ۷-۲ تجزیه و تحلیل سلولهای منفرد در یک سیستم ..... ۱۹
- ۱-۷-۲ امیدانس فلوسایتومتری ..... ۲۲
- ۲-۷-۲ نظریه امیدانس فلوسایتومتری ..... ۲۰
- ۳-۷-۲ مدل الکتریکی سلول منفرد ..... ۲۰
- ۸-۲ نیروی الکتروفرورسیس و دی الکتروفرورسیس ..... ۲۲
- ۹-۲ نیروی پسا ..... ۲۶

## ۲۷ فصل سوم: مروری بر پژوهشهای پیشین

- ۱-۳ روشهای شناسایی و جداسازی بدون استفاده از دستگاه میکروفلوئیدیک ..... ۲۶
- ۱-۱-۳ روش سانتریفیوژ ..... ۲۶
- ۲-۱-۳ استفاده از فیلتر غشایی ..... ۲۷
- ۲-۳ روشهای شناسایی و جداسازی با استفاده از دستگاه میکروفلوئیدیک ..... ۲۸
- ۱-۲-۳ دستگاههای میکروفلوئیدیک غیرفعال ..... ۳۰

۳۴	۲-۲-۳ دستگاه‌های میکروفلوئیدیک فعال
۴۰	۳-۲-۳ شناسایی و جداسازی به روش سایتومتری
۴۵	۳-۳ راهکار مورد استفاده در این پژوهش
۴۷	<b>فصل چهارم:</b>
۴۷	<b>طراحی و شبیه‌سازی و ساخت</b>
۴۸	۴-۱-۱ مقدمه
۴۸	۴-۲-۱ طراحی
۴۸	۴-۲-۲ تئوری سیال
۵۰	۴-۲-۲-۲ خواص فیزیکی ذرات
۵۰	۴-۲-۲-۳ اثر نوع میدان الکتریکی اعمالی
۵۱	۴-۲-۲-۴ انتخاب ولتاژ و سرعت سیال
۵۳	۴-۲-۲-۵ هندسه
۵۴	۴-۲-۲-۶ انتخاب ماده و مشخصات ذرات
۵۵	۴-۲-۲-۷ انتخاب شرایط مرزی
۵۵	۴-۲-۲-۸ انتخاب فیزیک
۵۶	۴-۳-۱ شبیه‌سازی
۵۶	۴-۳-۱-۱ نرم افزار
۵۷	۴-۳-۲ ساختار میکروفلوئیدیک نهایی
۵۸	۴-۳-۳ توزیع پتانسیل الکتریکی در ساختار
۶۰	۴-۳-۴ سرعت سیال
۶۱	۴-۳-۵ مسیر حرکت ذرات
۶۳	۴-۴ ساخت سامانه میکروفلوئیدیک جهت تشخیص سلول سرطانی

۶۴	..... ۱-۴-۴ طراحی و پیاده سازی الکتروود
۶۴	..... ۲-۴-۴ ساخت الکتروود
۶۶	..... ۳-۴-۴ ساخت میکروکانال
۶۸	..... ۴-۴-۴ انتخاب سیال
۷۱	..... ۵-۴-۴ مدل مداری کانال دارای سیال
۷۱	..... ۶-۴-۴ محاسبه‌ی اجزای الکتریکی سلول سرطانی
۷۳	..... ۷-۴-۴ تجهیزات آزمایش
۷۴	..... ۸-۴-۴ نتایج و بحث
۷۵	..... ۹-۴-۴ شناسایی سلول سرطانی
۸۰	..... ۱۰-۴-۴ مقایسه نتایج حاصل از پیاده سازی با مدل
۸۱	..... ۱۱-۴-۴ جمع بندی

۸۷ **فصل پنجم:**

۸۷ **جمع بندی، نتیجه‌گیری و ارائه پیشنهادها**

۸۵..... ۱-۵ جمع بندی

۹۰..... ۲-۵ پیشنهادها

۸۹ **مراجع**

۹۶ **پیوست**

## فهرست جداول

- جدول ۴-۱ خواص دی الکتریک سلول ها ..... ۵۵
- جدول ۴-۲ خواص سیال مورد بررسی ..... ۶۴
- جدول ۴-۳ مشخصات سلول ..... ۸۴
- جدول ۴-۴ مقادیر مدار معادل ..... ۸۴
- جدول ۴-۵ مقایسه ساختارها جهت جداسازی ..... ۹۵
- جدول ۴-۶ مقایسه ساختارها جهت شناسایی ..... ۹۵

## فهرست اشکال

- شکل ۱-۲: جداسازی سلولهای توموری در گردش ..... ۱۴
- شکل ۲-۲: اسیدهای نوکلئیک آزاد در گردش خون ..... ۱۵
- شکل ۳-۲: نانو مواد ..... ۲۰
- شکل ۴-۲: مدل دولایه سلولی  $\epsilon m$  و  $\epsilon mem$  و  $\epsilon i$  بیانگر نفوذ پذیری میباشد و  $\sigma m$  و  $\sigma mem$  و  $\sigma i$  بیانگر رسانایی محیط میباشد ..... ۲۶
- شکل ۱-۳: روش سانتریفیوژ برای شناسایی و جداسازی سلولها ..... ۳۱
- شکل ۲-۳: دستگاه میکروفلوئیدیک مبتنی بر فیلتراسیون ..... ۳۳
- شکل ۳-۳: دستگاه میکروفلوئیدیک با هندسه استخوان ماهی ..... ۳۵
- شکل ۴-۳: دستگاه میکروفلوئیدیک CTC-i Chi p ..... ۴۰
- شکل ۵-۳: عملکرد دستگاه شناسایی و جداسازی سلولهای آزاد اسید دئوکسی نوکلئیک ..... ۴۰
- شکل ۶-۳: سیستم فیلتراسیون صوتی ..... ۴۲
- شکل ۷-۳: شماتیک یک میکروفلوئیدیک سایتومتری امپلی فایر مدار رزونانسی سری را ایجاد میکند که توسط سلف گسسته و امپدانس بین الکترودها اندازه گیری میشود ..... ۴۴
- شکل ۸-۳: سامانه میکروفلوئیدیک امپدانس فلوسایتومتری با کانال منقبض شده ..... ۴۶
- شکل ۹-۳: نمای کلی از آزمایش با استفاده از سامانه میکروفلوئیدیک امپدانس فلوسایتومتری با کانال منقبض شده ..... ۴۷
- شکل ۱-۴: نمودار سرعت بر حسب عرض کانال ..... ۵۶
- شکل ۲-۴: نمودار ولتاژ بر حسب فاصله الکترودها ..... ۵۷
- شکل ۳-۴: هندسه سامانه میکروفلوئیدیک ترکیبی با استفاده نیروی گریز از مرکز و میدان الکتریکی ..... ۶۰

- شکل ۴-۴: جانمایی الکترودها ..... ۶۰
- شکل ۴-۵: جانمایی الکترودهای کانال اصلی سامانه میکروفلوئیدیک ترکیبی با استفاده نیروی گریز از مرکز و میدان الکتریکی ..... ۶۱
- شکل ۴-۶: نمای کلی از میکروفلوئیدیک ..... ۶۴
- شکل ۴-۷: الف) کانتور پتانسیل الکتریکی ب) کانتور شدت میدان الکتریکی ..... ۶۵
- شکل ۴-۸: نیروی دی الکتروفورسیس برای گلبولهای سفید خون و سلولهای سرطانی ..... ۶۶
- شکل ۴-۹: کانتور سرعت سیال در قسمت های مختلف ..... ۶۷
- شکل ۴-۱۰: نمودار نیروی پسا تحت سرعتهای مختلف ..... ۶۸
- شکل ۴-۱۱: حرکت ذرات درون میکروکانال ..... ۶۹
- شکل ۴-۱۲: الف) بازدهی برحسب ولتاژ ب) بازدهی برحسب سرعت سیال ..... ۷۰
- شکل ۴-۱۳: الف) فیلم لیتوگرافی الکترو د (ب) استفاده از کروم به عنوان لایه واسط ..... ۷۴
- شکل ۴-۱۴: مراحل ساخت الکترو د مرحله الف) ریختن فتوریزستور و چرخش به وسیله اسپین کوتر مرحله ب) نوردهی فرابنفش مرحله ج) زدایش فتوریزستور سفت نشده تیتانیوم و نیکل ..... ۷۵
- شکل ۴-۱۵: نمای میکروسکوپی الکترودها ..... ۷۵
- شکل ۴-۱۶: فیلم لیتوگرافی میکروکانال ..... ۷۶
- شکل ۴-۱۷: مراحل ساخت دستگاه به روش لیتوگرافی ..... ۷۷
- شکل ۴-۱۸: مدل الکتریکی سلول در حالت تعلیق،  $R_m$  و  $C_m$  به ترتیب مقاومت و خازن محیط تعلیق،  $R_i$  و  $C_{mem}$  به ترتیب مقاومت هسته و خازن سیتوپلاسم میباشند ..... ۸۳
- شکل ۴-۱۹: نمودار راکتانس خازن غشایی نسبت به فرکانس ..... ۸۵
- شکل ۴-۲۰: وسایل آزمایشگاهی الف) مبدل آنالوگ، ب) امپدانس سنج، ج) سرنگ مکانیکی ..... ۷۸
- شکل ۴-۲۱: مجموعه تجهیزات پیاده آزمایش به روش سایتومتری ..... ۷۸
- شکل ۴-۲۲: سامانه میکروفلوئیدیک نهایی ..... ۸۰
- شکل ۴-۲۳: ابعاد سامانه میکروفلوئیدیک ..... ۸۲

- شکل ۴-۲۴: شماتیک مجموعه تجهیزات پیاده آزمایش به روش سایتومتری ..... ۸۶
- شکل ۴-۲۵: شناسایی سلول سرطانی در سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود نیکل (الف) زمان عبور سلول (ب) منحنی امپدانس ..... ۴۸
- شکل ۴-۲۶: شناسایی سلول سرطانی در سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود تیتانیوم (الف) زمان عبور سلول (ب) منحنی امپدانس ..... ۸۹
- شکل ۴-۲۷: مقدار جریان عبوری از سلول‌ها در سامانه میکروفلوئیدیک تیتانیوم ..... ۹۱
- شکل ۴-۲۸: مقدار جریان عبوری از سلول‌ها در سامانه میکروفلوئیدیک نیکل ..... ۹۲
- شکل ۴-۲۹: مقایسه امپدانس سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود نیکل ..... ۹۰
- شکل ۴-۳۰: مقایسه امپدانس سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود تیتانیومی ..... ۹۰
- شکل ۱: دستگاه کندوپاش ..... ۹۶
- شکل ۲: دستگاه لایه نشانی چرخشی ..... ۹۷
- شکل ۳: دستگاه زدایش عمیق راکتیو ..... ۹۸

# فهرست علائم

	علائم
امپدانس مختلط	$Z_{mix}$
خازن مختلط	$C_{mix}$
ضریب گذردهی محیط	$\epsilon_m$
ضریب گذردهی سیتوپلاسم	$\epsilon_{mem}$
ضریب گذردهی غشا	$\epsilon_i$
رسانایی محیط	$\delta_m$
رسانایی سیتوپلاسم	$\delta_{mem}$
رسانایی غشا	$\delta_i$
ضریب گذردهی مختلط محیط	$\epsilon_c$
فاکتور کلوزیوس موسوتی	$f_{cm}$
نیروی دی الکتروفورسیس	$F_{DEP}$
نیروی پسا	$F_D$
گرادیان میدان	$\nabla E$
شعاع لایه اول سلول	$R$
شعاع لایه دوم سلول	$d$

# فصل یکم: مقدمه

## ۱-۱ مقدمه

سرطان یکی از دلایل اصلی مرگ در جهان است. در سال ۲۰۱۲ سازمان بهداشت جهانی بیش از ۱۴/۱ میلیون مورد جدید سرطان در سرتاسر جهان و ۸/۲ میلیون مرگ و میر ناشی از سرطان گزارش داده است. به خوبی پذیرفته شده که تشخیص زودهنگام تنها راه مشخص برای شکست سرطان است و امروزه در کشورهای توسعه یافته بیشتر تشخیص سرطان به ابزار دقیق تصویربرداری حجیم و گران قیمت تکیه دارند. گردش سلول‌های توموری (CTC)<sup>۱</sup> یک نشانگر مهم برای انواع مختلف سرطان است از آنجا که CTC ها در جریان خون بسیار نادر هستند تجزیه و تحلیل دقیق و جداسازی CTC یک کار چالش برانگیز است. هدف ما در این پژوهش طراحی یک سامانه میکروفلوئیدیک است که به وسیله آن بتوانیم هرگونه از سلول‌های توموری گردش در خون را تشخیص دهیم که ابعاد این دستگاه تقریباً ۲۰۰ میلی‌متر و روش تشخیصی در این پژوهش برپایه امپدانس فلوسیتومتری بوده و فرکانس اندازه‌گیری امگا هرتز است.

میکروفلوئیدیک، علم و فن‌آوری بررسی دستگاه‌هایی است که قابلیت کارکردن با سیالات در اندازه‌های بسیار کوچک را دارند در این فن‌آوری از کانال‌هایی با ابعاد میکرومتر استفاده می‌شود. میکروفلوئیدیک نخستین بار به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن در آنالیزهای آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت که این ویژگی‌های منحصر به فرد عبارتند از امکان انجام سنجش با مقدار کمی از نمونه، انجام جداسازی‌ها با دقت و حساسیت بالا، هزینه پایین و زمان کوتاه انجام سنجش.

امپدانس فلوسیتومتری<sup>۲</sup> یک روش تشخیصی برای شناسایی CTC های بدون برچسب است. تغییرات مقاومت الکتریکی با فرکانس و ولتاژ به اندازه CTC ها و غلظت یونی داخل سلول وابسته است.

---

<sup>1</sup> Circulating Tumor Cell

<sup>2</sup> Impedance Flow Cytometry

## ۱-۲ چالش‌های پژوهش

میکروفلوئیدیک یکی از بخش‌های بین رشته‌ای سامانه‌های میکروالکترومکانیکی است که این بخش حاصل ارتباط بین رشته‌های الکترونیک، مکانیک، فیزیک و شیمی است [۲ و ۱].

انتخاب نام میکروفلوئیدیک به دلیل چند میکرومتری بودن ابعاد دستگاه است. سامانه میکروفلوئیدیک به کنترل و بررسی حجم‌های میکرو و نانو لیتری سیال‌ها می‌پردازد و این ابعاد برای گازها و سیالات مورد آزمایش باعث صرف نظر کردن از نیروی‌های سطحی می‌شود و روابط ساده‌تری برای حل معادلات بدست می‌آید [۳].

سامانه‌های میکروفلوئیدیک از بخش‌های مختلف و کانال‌هایی با ابعاد و اشکال مختلف تشکیل شده است که بیشتر آن‌ها برای بررسی و انجام تحقیقات بیوشیمی، پزشکی، تجزیه و تحلیل سلول‌های خونی می‌پردازد. این گونه سامانه‌ها ویژگی برجسته‌ای در مخلوط کردن، شناسایی و جداسازی ذرات را دارند و از مزیت آن می‌توان از هزینه بسیار کم برای ساخت نام برد [۳ و ۴].

کاربرد میکروفلوئیدیک یکی از چالش برانگیزترین موضوعات مهندسی در قرن اخیر بوده است. این فن‌آوری ترکیبی از علوم مهندسی، زیست‌شناسی، فیزیک و شیمی است و یکی از اهداف اصلی آن توسعه این ریز سیالات می‌باشد. میکروفلوئیدیک کاربردهای گسترده‌ای دارد که عبارت است از

- سنجش گلوکوز
- آنتن بر پایه میکروفلوئیدیک با قابلیت تنظیم
- چاپگرهای جوهر افشان
- سیستم‌های خنک کننده مدار مجتمع بر پایه میکروفلوئیدیک
- تشخیص ذرات سولفات موجود در هوا
- مطالعات سلول‌های بنیادی و ذرات تشکیل دهنده خون

که در این کاربردها صنعت پزشکی اقبال بیشتری به میکروفلوئیدیک نشان داده است و مهندس‌ها باید تلاش خود را برای بهبود و بهینه سازی این فن‌آوری دو چندان کنند.

## ۱-۳ اهمیت و کاربرد موضوع

در سال‌های اخیر تعداد بیماران که به علت بیماری سرطان از دنیا می‌روند رو به افزایش است که کشور ما بیشترین رشد ابتلا به سرطان را در جهان دارا است. از این رو تلاش‌های بسیار زیادی برای کنترل این بیماری شده‌است محققان بر این باور هستند تشخیص سریع و به موقع مهم‌ترین فاکتور برای درمان این بیماری است.

روش‌های تشخیص متعددی برای سرطان وجود دارد. در این پژوهش با بهره‌گیری از سامانه میکروفلوئیدیک برای شناسایی و جداسازی سلول‌های سرطانی در گردش تلاش بر کاهش زمان تشخیص و افزایش سرعت شناسایی شده‌است. محققان امیدوارند بتوانند با کشف توالی ژنوم این سلول‌های سرطانی گردشی، برای هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی هر بیمار روش منحصر به فردی را به کار ببرند.

## ۱-۴ اهداف این پژوهش

هدف نهایی هرفن‌آوری، شناسایی و تشخیص سلول‌های توموری در گردش است که قادر به تشکیل متاستاز هستند با این حال ویژگی چنین سلول‌های توموری در گردش در حال حاضر روشن نیست. علاوه بر این، این احتمال وجود دارد که ویژگی‌ها منحصر به سرطان‌های مختلف باشد بنابراین قابل تصور است که یک رویکرد خاص برای هرنوع تومور خاص بهینه‌سازی شود.

هدف از انجام این پژوهش بهبود و بهینه‌سازی مکانیزم غیر تهاجمی سلول‌های سرطانی با استفاده از روش فعال به منظور افزایش سرعت و دقت شناسایی سلول‌های سرطانی در گردش می‌باشد.

## ۱-۵ ساختار پایان نامه

در فصل اول ضرورت انجام تحقیق و اهداف پژوهش بیان شده‌است. در فصل دوم به تعریف مفاهیم پایه‌ای تحقیق مانند انواع سرطان، نشانگرهای زیستی، تئوری امپدانس فلوسایتومتری، نیروی دی

الکتروفروسیس و نیروی پسا پرداخته شده است. در فصل سوم به معرفی راهکارهای جداسازی و شناسایی سلول‌های سرطانی با روش‌های سانتریفیوژ، فیلتراسیون و میکروفلوئیدیک فعال (دی الکتروفروسیس، مغناطیسی، آکوستیک، سایتومتری) و غیر فعال (نیروی گریز از مرکز، فیلتراسیون، نیروی کششی دین) پرداخته شده است، در فصل چهارم علاوه بر ساخت دستگاه کار شبیه سازی سامانه میکروفلوئیدیک برای جداسازی سلول‌های سرطانی با استفاده از نرم افزار کامسول انجام گرفته است و از نظر میزان بازدهی جداسازی سلول در ولتاژها و سرعت سیال متفاوت بررسی می‌شود تا پژوهش کاملی هم از نظر جداسازی و شناسایی انجام شده باشد. در ادامه به روش‌های ساخت سامانه میکروفلوئیدیک می‌پردازیم و نتایج شناسایی سلول سرطانی و جریان عبوری از سلول‌ها را بررسی می‌کنیم و در آخر نتایج بدست آمده از دو الکتروود نیکل و تیتانیوم مورد بررسی و مقایسه قرار می‌گیرد.

# فصل دوم : معانی مهم یاد تحقیق

## ۲-۱ مقدمه

در این فصل در ابتدا تعریف سرطان و انواع سرطان‌های رایج در جهان و سپس نشانگرهای سرطان که در خون در چرخش هستند، روش‌های شناسایی و جداسازی آن‌ها توضیح داده شده‌است. در ادامه مفاهیم و تاریخچه سیستم‌های میکروفلوئیدیک بیان شده است و در آخر روش شناسایی فلوسیتومتری که پایه سیستم در این پژوهش است معرفی گردیداست تا خواننده با مفاهیم پژوهش آشنا شود

## ۲-۲ سرطان

سرطان (چنگار) نامی است که به مجموعه‌ای از بیماری‌هایی اطلاق می‌شود که از تکثیر مهار نشده‌ی سلول‌ها پدید می‌آیند. برآورد لازم از آژانس بین‌المللی سرطان میزان مرگ و میر در سراسر جهان برآورد ۲۷ سرطان عمده ۸/۲ میلیون مرگ در سال ۲۰۱۲ بوداست.

اگرچه به خوبی پذیرفته شده که تشخیص زودهنگام تنها راه مشخص سرطان است تا امروز حتی در کشورهای توسعه یافته بیشتر تشخیص سرطان به ابزار دقیق تصویربرداری حجیم و گران قیمت تکیه دارند. تحقیقات ثابت کرده‌اند که عوامل مختلفی از جمله ژنتیک (جهش‌های ارثی)، محیط زیست (الکل، اشعه، دود) و قرارگرفتن در معرض مواد شیمیایی سرطان‌زا نقش مهمی در پیشرفت آن دارند.

## ۲-۲-۱ انواع سرطان

شایع‌ترین سرطان‌ها به ترتیب سرطان ریه ۱/۸ میلیون، سرطان سینه ۱/۶۷ میلیون، سرطان روده-بزرگ ۱/۳۶ میلیون است. شایع‌ترین علل مرگ ناشی از سرطان، مرگ بر اثر سرطان ریه ۱/۶ میلیون، مرگ بر اثر سرطان کبد ۷۴۵۰۰۰، مرگ بر اثر سرطان معده ۷۳۲۰۰۰ می‌باشد. براساس برآورد سازمان جهانی در سال ۲۰۱۲ سرطان مرگ و میر بیشتری نسبت به همه بیماری‌های قلبی و عروقی یا سکت‌های مغزی ایجاد می‌کند [۶].

## ۲-۲-۲ سرطان ریه

نوعی بیماری است که مشخصه آن رشد کنترل نشده سلول‌ها در بافت ریه می‌باشد و سرطان ریه به عنوان شایع‌ترین سرطان در جهان ظهور کرده‌است. با توجه به برآورد سال ۲۰۱۲، ۵۸٪ این بیماری در مناطق کمتر توسعه یافته رخ داده‌است. این بیماری شایع‌ترین نوع سرطان در بین مردها می‌باشد [۷].

## ۲-۲-۳ سرطان سینه

ناشی از رشد سلول‌های غیرطبیعی در سینه می‌باشد. زن بودن مهم‌ترین عامل این نوع بیماری است ولی گاهی مردها نیز به این سرطان دچار می‌شوند که تعداد آن بسیار ناچیز است. این بیماری دومین سرطان شایع در جهان است و اکنون دومین علت مرگ و میر در مناطق توسعه یافته است. در کشورهای غربی سنین ابتلا به این بیماری ۵۰ سال می‌باشد ولی در کشور ما بیماران جوان‌تر هستند و در بسیاری از موارد به دلیل بی‌اطلاعی افراد بیماری در مرحله پیشرفته‌تری قرار دارد [۸].

## ۲-۲-۴ سرطان روده بزرگ

روده بزرگ بخشی از سیستم گوارشی که شامل مری، معده، روده بزرگ و روده کوچک می‌باشد. در این بیماری سلول‌ها در داخل بافت روده شروع به تکثیر می‌کنند. این بیماری یکی از معمول‌ترین سرطان‌های بشر به حساب می‌آید. بیش از ۷۰٪ این بیماری در کشورهای توسعه یافته و بیش از نیمی از آن در آسیای شرقی اتفاق می‌افتد و میزان ابتلا به این بیماری در مردان دو برابر زنان می‌باشد. اگر این بیماری در مراحل اول تشخیص داده شود، بیماری درمان پذیر است و احتمال بهبودی آن زیاد است [۸ و ۹].

## ۲-۲-۵ سرطان پوست

سرطانی است که از سلول‌های سرطانی بدخیم در لایه‌های بیرونی پوست ایجاد می‌شود. متداول و شایع‌ترین سرطان در اروپا می‌باشد. اکثر بیماران این سرطان درمان می‌گردند اما به دلیل ابتلای زیاد

به این بیماری مرگ و میر قابل توجهی دارد که این میزان مرگ و میر نگرانی زیادی بین محققان ایجاد کرده است.

## ۲-۳ خون

خون دارای دو ماده مشتق شده از سلول‌های سرطان است، که مستعد تجزیه و تحلیل مولکولی دقیقی هستند.

- سلول‌های توموری در گردش<sup>۱</sup>

- اسید دئوکسی نئوکلیک<sup>۲</sup>

سلول‌های توموری در گردش از ذخایر اولیه یا متاستاتیک دفع می‌شود اگرچه نادر هستند ولی تجزیه و تحلیل ساده‌تری نسبت به اسید دئوکسی نئوکلیک را دارند و برای تحلیل آن سلول‌ها نیاز به پلتفرم‌های جدیدتر و پیچیده‌تری است [۱۰].

## ۲-۳-۱ نشانگرهای زیستی<sup>۳</sup>

نشانگرهای زیستی به شکل فیزیولوژیکی یا پاتولوژیکی یک ارگان خاصی هستند، که بسته به ویژگی‌هایشان می‌توانند در خون یا سایر مایعات بدن حضور داشته باشند.

فیزیولوژیکی بودن به این معنی است که این نشانگرها از سلول طبیعی بدن آزاد شده‌اند و پاتولوژیکی بودن به این معنی است که این نشانگرها از سلول غیر طبیعی بدن آزاد شده‌اند. نشانگرهای زیستی

---

<sup>1</sup> Circulating Tumor Cell

<sup>2</sup> Deoxy Nucleic Acid

<sup>3</sup> Bio Marker

سرطانی در بدن شامل سلول‌های توموری گردشی، سلول‌های اسید دئوکسی نوکلئیک<sup>۱</sup>، سلول‌های توموری گردشی اسید دئوکسی نوکلئیک<sup>۲</sup>، سلول‌های بنیادی سرطانی<sup>۳</sup> می‌باشند.

## ۴-۲ نشانگرهای زیستی سرطان

### ۴-۲-۱ سلول‌های توموری گردشی اسید دئوکسی نوکلئیک (ct-DNA)

اسید دئوکسی نوکلئیک‌ها درون هسته سلول وجود دارند. وقتی تومورها رشد می‌کنند سلول‌های دیگر می‌میرند و با سلول زنده جایگزین می‌شوند، سلول‌های مرده تجزیه می‌شوند و محتویات آن‌ها از جمله تومورهای در گردش به رشته‌های کوچکتری تقسیم می‌شوند به این رشته‌های کوچک شده سلول‌های توموری گردشی اسید دئوکسی نوکلئیک می‌گویند [۱۱].

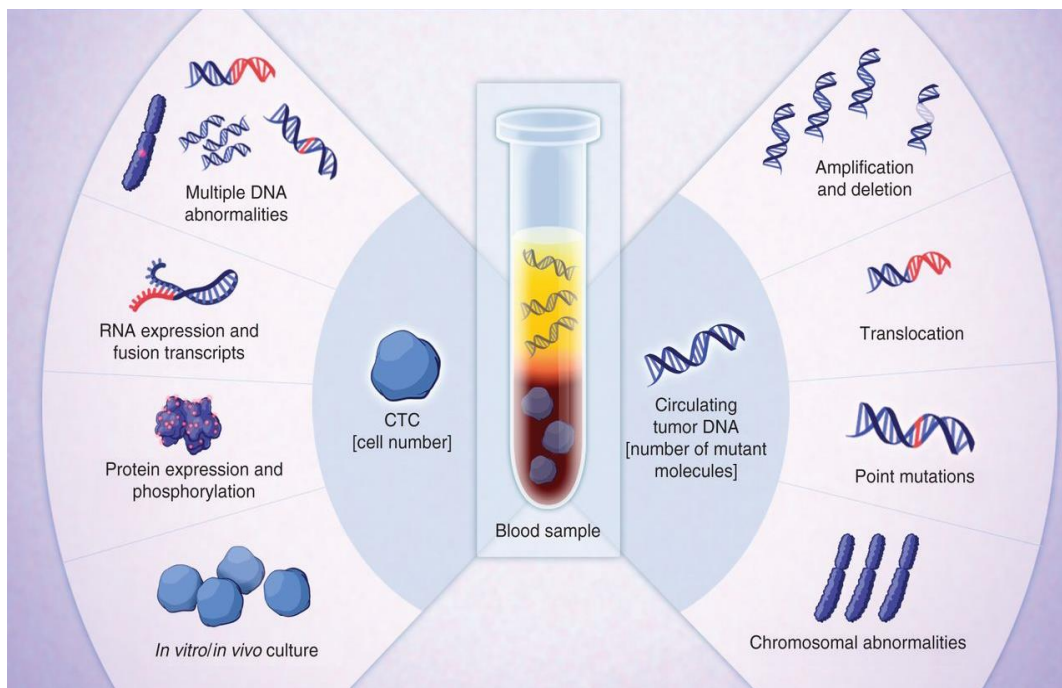
از آنجا که تغییرات ویژه سلول‌های توموری گردشی اسید دئوکسی نوکلئیک درون سلول‌ها وجود ندارد یک رویکرد ویژه‌ای برای تشخیص سرطان ارائه می‌دهند. از نظر بالینی تجزیه و تحلیل سلول‌های توموری گردشی اسید دئوکسی نوکلئیک بسیار راحت می‌باشد به طور معمول بین ۵ تا ۱۰ میلی لیتر خون نیاز دارد که در لوله‌های آزمایشگاهی با یک ماده ضد انعقاد خون مخلوط می‌شوند مایع رویی پلاسما برداشته می‌شود سلول‌های توموری گردشی اسید دئوکسی نوکلئیک با روش تجاری از پلاسما جدا می‌شوند [۱۲].

---

<sup>1</sup> Cell Free Deoxy Nucleic Acid

<sup>2</sup> Circulating Tumor Deoxy Nucleic Acid

<sup>3</sup> Circulating Stem Cell

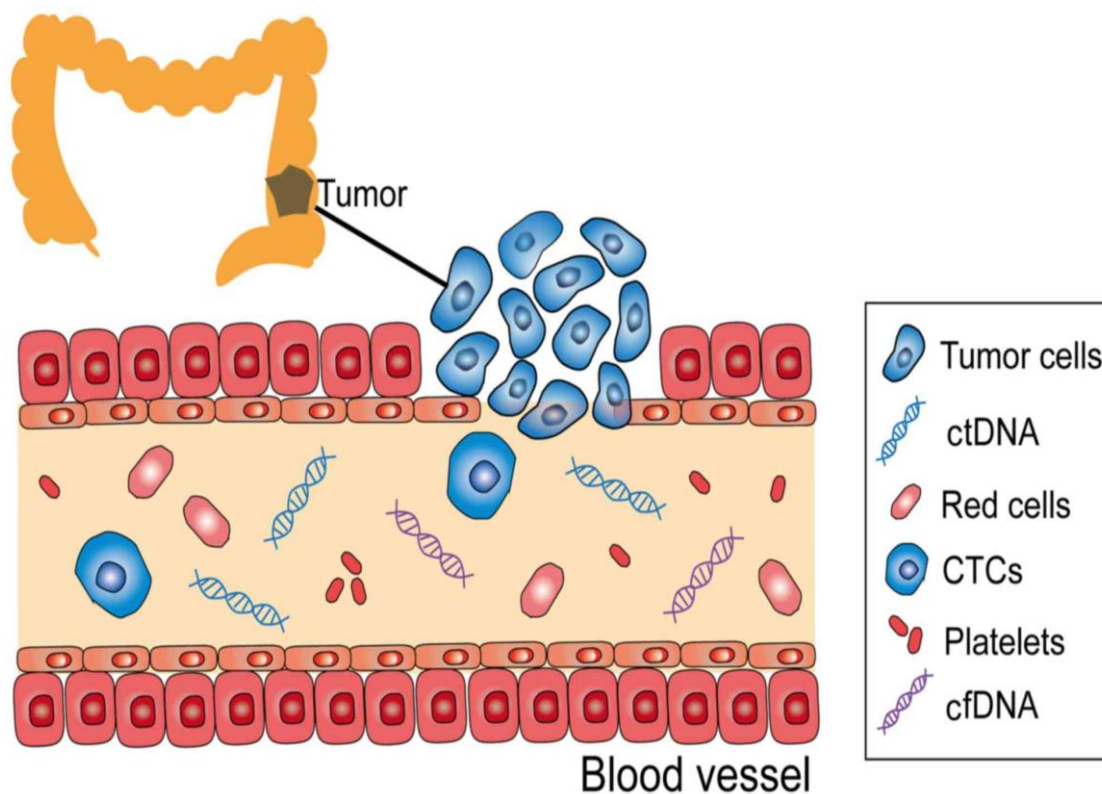


شکل ۱-۲: جداسازی سلول‌های توموری در گردش [۱۲]

## ۲-۴-۲ اسید دئوکسی نوکلئیک بدون سلول (cf-DNA)

در پلاسمای خون تعداد زیادی از اسیدهای نوکلئیک آزاد وجود دارند که قسمت قابل توجهی از آن را سلول‌های آزاد اسید دئوکسی نوکلئیک تشکیل داده‌اند. سلول‌های اسید دئوکسی نوکلئیک بدون سلول از اسیدهای نوکلئیک آزاد تک رشته یا دو رشته تشکیل شده است. در سال ۱۹۴۸ ماندل؛ حضور اسیدهای دئوکسی نوکلئیک آزاد سلولی در خون انسان بیمار و سالم شناسایی و اندازه‌گیری کرد. و در سال ۱۹۶۶ پزشکان سطح بالاتری از سلول‌های آزاد اسید دئوکسی نوکلئیک را از بیماری لوپوس کشف کردند. و تا سال ۱۹۹۴ جهش خاصی درون این سلول‌های آزاد اسید دئوکسی نوکلئیک کشف نشد [۱۴ و ۱۵].

<sup>1</sup> Mandel



شکل ۲-۲: اسیدهای نوکلئیک آزاد در گردش خون [۱۳]

تعداد اسیدهای نوکلئیک آزاد درون بدن بیماران سرطانی متفاوت است و این تعداد به نوع سرطان و مرحله‌ی سرطان بستگی دارد. غلظت اسیدهای نوکلئیک آزاد در خون بیماران سرطانی خیلی بیشتر از انسان‌های سالم است و غلظت آن به طور میانگین تا ۱۸۰ نانوگرم بر میلی لیتر تغییر می‌کند. روش‌های مختلفی برای شناسایی اسیدهای نوکلئیک آزاد وجود دارد با این حال اسیدهای نوکلئیک آزاد می‌تواند با روش تشخیص ناهنجاری‌های ژنتیکی که در سلول‌های توموری مورد استفاده قرار می‌گیرد شناسایی می‌کنند [۱۶].

### ۲-۴-۳ سلول‌های بنیادی سرطانی (CSC)

سلول‌های بنیادی سرطانی، توانایی خود نوسازی و تولید ناهمگونی از سلول‌های سرطانی مولد تومور را دارند.

سلول‌های بنیادی سرطانی به عنوان نیروی محرکه تومورزایی و دانه‌های متاستاز شناسایی شده‌اند. مدل سلول‌های بنیادی سرطان بیان می‌کند که تومورها به صورت سلسله مراتبی با زیر مجموعه‌ای از سلول‌های تومور در راس خود سازماندهی می‌شوند که دارای خود بازسازی قوی هستند. بنابراین این مدل نشان می‌دهد که این تومورها می‌توانند به طور بالقوه چندین پدیده را توضیح دهند که در حال حاضر به طور کامل نادیده گرفته می‌شوند. سلول‌های بنیادی سرطانی در تومورهای جامد با استفاده از لیست گسترده‌ای از نشانگرهای زیستی شناسایی می‌شوند با این حال نشانگرهای زیستی قابل اعتماد نیستند بنابراین باید هنگام استفاده از آنها احتیاط لازم را انجام داد [۱۷].

## ۲-۴-۴ سلول‌های توموری در گردش (CTC)

محققان نزدیک به ۱۰۰ سال است که در حال مطالعه متاستاز هستند. اخیرا اطلاعات و دلیل‌هایی بدست آورده‌اند که برخی تومورهای خاص تمایل به متاستاز به اندام‌های خاص دارند.

در سال ۱۸۸۹، جراح انگلیسی به نام استفان پاگت<sup>۱</sup> بیش از ۹۰۰ گزارش کالبد شکافی بیمار را با تومور اولیه مورد بررسی قرار داد. او یک الگوی غیرتصادفی از متاستاز به اندام‌ها و استخوان‌ها را اثبات کرد که این الگو نشان داده‌است متاستاز رفتار تصادفی ندارد بلکه دارای ویژگی خاص است که این رفتار را معادل کاشت بذر می‌داند.

در سال ۱۹۲۹، جیمز ایوینگ<sup>۲</sup> نظریه کاشت بذر را به چالش کشید و پیشنهاد کرد که انتشار متاستیک توسط عوامل صرفا مکانیکی که نتیجه ساختار تشریحی سیستم عروقی هستند رخ می‌دهد. در دهه‌ی ۱۹۷۰، ماهیت انتخابی متاستاز مشخص شد آزمایشات تجربی نشان داد که رفتار مکانیکی

---

<sup>1</sup> Stephen Paget

<sup>2</sup> James Ewing

سلول در اندام‌های دور تر می‌تواند رخ دهد اما تکثیر بعدی و رشد به ضایعات ثانویه تحت تاثیر سلول و ارگان خاصی از بدن قرار دارد [۱۸].

در اوایل تشکیل و رشد یک تومور (مانند سرطان پستان، سرطان کلیه یا پروستات)، سلول‌ها از تومور اولیه خارج می‌شوند و در جریان خون گردش می‌کنند. این سلول‌های توموری در گردش بسیار ناهمگن هستند و می‌توانند از طریق فناوری‌های مختلف و براساس ویژگی‌های فیزیکی و بیولوژیکی تومورها شناسایی و جداسازی شوند [۱۹].

بیماران سرطانی حتی با تومورهای اولیه کوچک عمدتاً توسط انتشار خونی سلول‌های توموری از محل اولیه به اندام‌های دورتر مانند مغز استخوان، کبد، ریه یا مغز و رشد بعدی این سلول‌ها در محیط جدید این‌ها تعیین می‌شود. سلول‌های توموری پراکنده<sup>۱</sup> به عنوان ریز متاستاز شناخته می‌شود این‌ها می‌توانند سال‌ها بعد پس از برداشته شدن کامل تومور اولیه و قبل از افزایش متاستاز به میکرومتاستاز در حالت خواب باقی بمانند. سلول‌های توموری پراکنده که دوباره در جریان خون حرکت می‌کنند ممکن است در سایر اندام‌های دور دست کلونیزه شوند و منجر به متاستاز ثانویه شوند. به طور جالب توجه‌ای سلول‌های توموری پراکنده حتی می‌توانند به تومور اولیه (فرایندی به نام بارور سازی تومور) بازگردند که منجر به انواع تهاجمی متاستیک می‌شوند [۲۲ و ۲۳].

سلول‌های توموری در گردش بسیار کم یاب هستند. تعداد سلول‌های خونی معمولی در مقایسه باهم بسیار زیاد است بیماران مبتلا به سرطان ممکن است سطوح دیگر سلول‌های خونی را تغییر داده باشند این گروه‌های سلولی ممکن است شامل لکوسیت‌ها (تقریباً ۷ میلیون / میلی‌لیتر خون) و گلبول قرمز خون (تقریباً ۵ میلیارد / میلی‌لیتر خون) با فرض اینکه تمام سلول‌های توموری در گردش از تومورهای اولیه خارج شدند باشند. در سیستم گردش خون بازده برآورد شده برابر ۲۰۰ میلی‌لیتر خون از یک

---

<sup>1</sup> Diffused Tumor Cell

بیمار مرد بدست آمده‌است بنابراین سلول‌های توموری در گردش باید از نظر تئوری در ۰/۰۰۰۴ درصد از تمام سلول‌های منوکئوله شده در خون حاضر باشند [۲۴].

## ۲-۵ شناسایی سلول‌های توموری در گردش

هدف نهایی هر فن‌آوری، شناسایی و تشخیص سلول‌های توموری در گردش است که قادر به تشکیل متاستاز دور دست هستند. روش‌های مختلفی برای شناسایی و جداسازی سلول‌های سرطانی وجود دارد که می‌توان به روش‌هایی مانند نیروی گریز از مرکز، نیروی کششی دین، نیروی دی‌الکتروفورسیس، نیروی آکوستیک که به صورت کامل در فصل بعد توضیح داده شده‌است اشاره کرد. لازم به ذکر است بسیاری از روش‌های فعلی برای جداسازی و شناسایی کردن سلول‌های توموری در گردش براساس زیستی متکی هستند که یک رویکرد پر تکرار جداسازی سلول‌های توموری در گردش با استفاده از این واقعیت است [۲۵].

در این پژوهش سعی شده‌است با بهره‌گیری از سامانه میکروفلوئیدیک و با استفاده از روش‌های غیر تهاجمی که کمترین آسیب را بر روی سلول‌های سرطانی وارد کند به جداسازی و شناسایی سلول‌های هدف پردازیم. در قسمت شبیه سازی از روش دی‌الکتروفورسیس برای جداسازی ذرات استفاده شده است و دلیل استفاده از این روش غیر تهاجمی بودن، سرعت بالای جداسازی، آسیب زدن کمتر به سلول‌هدف، و بر طرف کردن مشکل گرفتگی کانال در زمان استفاده از عمل فیلتراسیون می‌باشد. در قسمت شناسایی از روش امپدانس فلوسایتومتری استفاده شده‌است و دلیل استفاده از این روش کم هزینه بودن این روش نسبت به دیگر روش‌ها سرعت بسیار بالای شناسایی سلول‌های هدف است چون در این بیمار زمان شناسایی برای درمان یکی از فاکتورهای اصلی می‌باشد. در ادامه به معرفی کامل سامانه میکروفلوئیدیک و روش امپدانس فلوسایتومتری پرداخته شده‌است.

## ۲-۶ میکروفلوئیدیک

میکروفلوئیدیک، علم و فن آوری بررسی دستگاه‌هایی است که قابلیت کارکردن با سیالات در اندازه های بسیار کوچک را دارند. در این فناوری از کانال‌هایی با ابعاد میکرومتر استفاده می‌شود. میکروفلوئیدیک در علوم مختلف، از سنتزهای شیمیایی و آنالیزهای زیستی، تا اپتیک و فن آوری اطلاعات کاربردهای فراوانی دارد. میکروفلوئیدیک نخستین بار به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن در آنالیزهای آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت. این ویژگی‌های منحصر به فرد عبارت‌اند از امکان انجام سنجش با مقدار کمی از نمونه، انجام جداسازی‌ها با دقت و حساسیت بالا، هزینه پایین و زمان کوتاه انجام سنجش.

سیستم‌های میکروفلوئیدیک یک سکوی قدرتمند برای آماده سازی، عامل‌دار کردن و دستکاری مواد میکرو و نانو فراهم می‌کنند [۲۶]. مواد نانو و میکرو همان طور که اندازه آن‌ها تعریف شده‌است در سال‌های اخیر توجه بسیاری را جلب کرده‌است. ویژگی‌های ذاتی مواد در ابعاد نانو را می‌توان با تنظیم شکل ساختار و اجزای آن‌ها برای کاربرد خاص مناسب کرد [۲۷].

توانایی کنترل دقیق حرکت سلول‌ها در مقیاس میکرو برای کاربرد میکروسیال‌ها در تحقیقات بیولوژیکی و مراقبت‌های بهداشتی امری ضروری است. در طول ۲۰ سال گذشته، توسعه تکنولوژی میکروفلوئیدیک در درجه‌ی اول بر روی تکنیک‌هایی برای رسیدن به این کنترل از جمله، دی‌الکتروفورسیس، هیدروفورسیس<sup>۱</sup>، مگنتوفورسیس<sup>۲</sup> و تمرکز داخلی متمرکز شده‌است

## ۲-۶-۱ نانو مواد

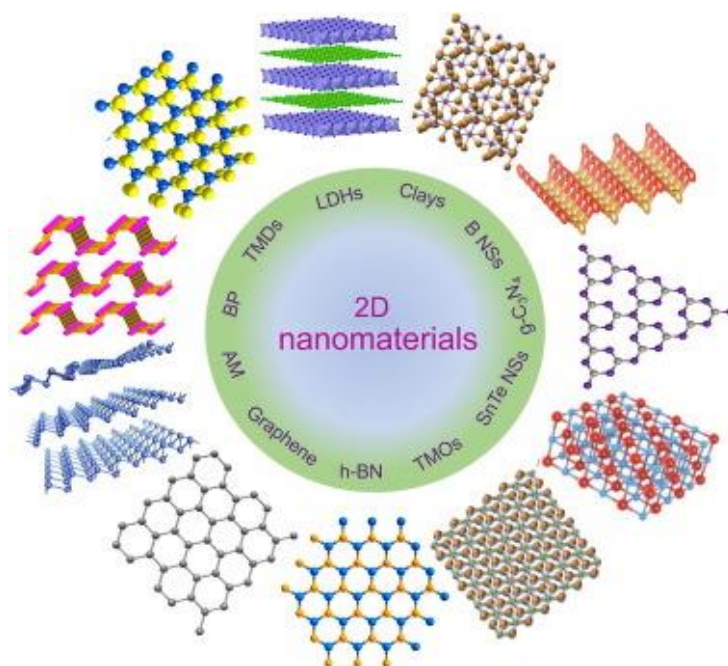
نانو مواد، معمولاً به عنوان داشتن اندازه کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر تعریف می‌شوند در حال حاضر کاربرد گسترده‌ای در زمینه الکترونیک، لیزر، کاتالیز، حسگرها، مهندسی پزشکی دارند. در دهه‌های گذشته

---

<sup>1</sup> Hydronephrosis

<sup>2</sup> Magnetophrosis

علاقه تحقیقاتی به مواد عمدتاً بر روی نانوذرات متمرکز بوده است. پراکندگی اندازه ذره و توزیع اندازه مهم‌ترین شاخصه‌های ارزیابی مواد نانو می‌باشد. بیشتر نانو مواد با ترکیب خاصی تهیه و ساخته می‌شود و رسوب باقی مانده نیز از سنتز اولیه می‌باشد



شکل ۲-۳ نانو مواد [۲۸]

## ۲-۶-۲ میکرو مواد

میکرو مواد معمولاً به اندازه ۱ تا ۱۰۰ میکرومتر در نظر گرفته می‌شود و همچنین در حال پیدا کردن کاربردهایی در لوازم آرایشی، چاپ، داروسازی، الکترونیک هستند. از آنجا که خواص شیمیایی و مکانیکی میکرو مواد به شدت به شکل و ساختار آن‌ها بستگی دارد. آماده سازی میکرو مواد غیر کروی با قابلیت جدید مورد بررسی قرار گرفته است. با این حال مواد میکرو جدید دارای ساختارها پیچیده تری هستند و ممکن است چندین ویژگی فیزیکی یا شیمیایی فراتر از الزامات سنتی مانند اندازه و شکل داشته باشند [۲۸].

## ۲-۶-۳ میکروفلوئیدیک فعال و غیر فعال

تا کنون هزاران تکنولوژی فعال و غیرفعال برای جداسازی سلول‌های سرطانی به کارگیری شده‌است. تکنیک فعال تکنیکی است که ذرات در یک جریان نسبتاً یکنواخت حرکت می‌کنند و سپس یک میدان خارجی مانند میدان الکتریکی یا مغناطیسی به ذرات اعمال می‌شود که باعث جدایی و شناسایی ذرات براساس خواص آن‌ها می‌شود و تکنیک غیرفعال تکنیکی است که ذرات با جریان ثابتی در حرکت هستند و هیچ‌گونه نیروی خارجی به آن‌ها اعمال نمی‌شود و بر اساس اندازه یا نیروی اینرسی ذرات جداسازی یا شناسایی می‌شوند [۳۴].

## ۲-۶-۴ کاربرد میکروفلوئیدیک

انواع زیادی از میکروفلوئیدیک برای کاربردهای مختلف وجود دارد که می‌توان غلظت یک نمونه را با اختلاط نفوذی با جریان شاخص اندازه‌گیری کند و برای شناسایی و جداسازی عناصری مانند آرایه‌های DNA و زیست حسگرها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

دستگاه‌های میکروفلوئیدیک پلیمری برای شیمی بالینی و تشخیص تجزیه خون بسیار مفید هستند علاوه بر این دستگاه‌های میکروفلوئیدیک برای جداسازی و شمارش سلولی فلوسیتومتری نیز به کار گرفته می‌شوند [۳۵ و ۳۶].

## ۲-۷ تجزیه و تحلیل سلول‌های منفرد در یک سیستم

هنگامی که یک سلول منفرد از یک سیستم میکروفلوئیدیک عبور می‌کند الکترودهای در کف سیستم می‌توانند سیگنال‌های امپدانس آن‌ها را تشخیص دهند. زمانی که یک سیگنال تحریک با جریان متناوب به الکترودها اعمال می‌شود سلول‌ها به عنوان ذرات کروی عایق می‌شوند و یا از خود مقاومت نشان می‌دهند در این هنگام یک جهش در پالس رخ می‌دهد که نشان دهنده‌ی افزایش مقاومت در شمارنده است که ارتفاع پالس سیگنال مقاومت سلول نسبت به سیال بیان می‌دارد.

## ۲-۷-۱ امیدانس فلوسایتومتری

امیدانس به صورت نسبت ولتاژ به جریان در یک جریان متناوب یا مستقیم بدست می‌آید. مقاومت زیستی سلول‌ها از ویژگی‌هایی است که برای بررسی خود سلول‌ها و یا وضعیت سلامت بدن مورد استفاده قرار می‌گیرد. اندازه‌گیری امیدانس سلول‌ها یک روش الکتروشیمیایی، غیر تهاجمی و بدون برچسب می‌باشد و به طور خودکار نتایج حساس را ارائه می‌دهد.

در دهه‌ی ۱۹۳۰ اولین بار مقاومت الکتریکی سلول‌های تخم مرغ دریایی و تخم قورباغه اندازه‌گیری و مورد آنالیز قرار گرفته‌است [۳۷]. در سال ۱۹۴۲ شمارشگر کولتر اولین بار توسط والاس هنری کولتر<sup>۱</sup> ارائه شد که روش کار این دستگاه اندازه‌گیری مقاومت سلول‌ها در فرکانس صفر و جریان مستقیم می‌باشد از آن زمان به بعد از دستگاه شمارشگر کولتر برای آنالیز مقاومت سلولی به طور گسترده و به عنوان یک معیار استفاده شده‌است [۳۸].

در سال ۱۹۷۹ هافمن نظریه‌ای با استفاده از جریان الکتریکی متناوب و فرکانس بالا برای اندازه‌گیری مقاومت سلول‌ها ارائه کرده است و در دهه‌ی ۱۹۸۰ یکی دیگر از تکنیک‌های مبتنی بر امیدانس به نام سنجش امیدانس سلول زیر لایه برای بررسی سلول‌های چسبنده طراحی شده است که این بررسی‌های اولیه اساس و پایه روش‌های آنالیز سلولی مبتنی بر امیدانس الکتریکی می‌باشد.

اخیرا با استفاده از علوم میکرو و نانو و تکنیک‌های میکروفلوئیدیک برای ساخت الکترودهای ریز مقیاس و کانال‌های سیال دستگاه‌های اندازه‌گیری سلول مبتنی بر امیدانس در زمینه‌های مختلف مانند تحقیقات پایه زیست‌شناسی سلول‌ها، مرتب‌سازی سلول‌ها، تحقیق در مورد سلول‌های سرطانی ارائه شده‌است [۳۹].

---

<sup>1</sup> Wallace Henry Coulter

<sup>2</sup> Hoffman

## ۲-۷-۲ نظریه امیدانس فلوسایتومتری

در سنجش امیدانس یک سیگنال تحریک وابسته به فرکانس به سیستم مورد نظر اعمال می‌شود و پاسخ آن اندازگیری می‌شود که معمولاً سیگنال تحریک یک ولتاژ متناوب و پاسخ آن معمولاً جریان الکتریکی می‌باشد سپس می‌توان امیدانس مختلط را به صورت زیر محاسبه کرد [۴۰]

$$z(\omega) = \frac{U(\omega)}{I(\omega)} = z_{re} + jz_{im} \quad (1-2)$$

که در آن  $z = \sqrt{-1}$  و  $\omega$  فرکانس می‌باشد که قسمت حقیقی و موهومی امیدانس به ترتیب مقاومت و راکتانس نامیده می‌شوند. روش‌های مختلفی برای بررسی سلول‌ها وجود دارد تکنیک‌های متفاوتی وجود دارد که با یکدیگر تفاوت دارند اما نظریه پایه یکسانی هستند [۴۰ و ۴۱].

## ۳-۷-۲ مدل الکتریکی سلول منفرد

نظریه رایج و مدل تکنیک‌های مبتنی بر امیدانس مدل الکتریکی یک سلول منفرد در یک محیط آبی است. چندین بررسی برای این مدل وجود دارد که یکی از آن‌ها به اختصار توضیح داده می‌شود. برای سلول‌های بیولوژیکی با غشا پلاسمایی و دولایه چربی مدل الکتریکی یک سلول که تک پوسته است که دارای یک کره رسانا و یک پوسته نازک عایق می‌باشد این مدل را می‌توان با نظریه ماکسول توضیح کرد که گذردهی معادل به صورت زیر محاسبه می‌شود [۴۰ و ۴۱ و ۴۲].

$$\varepsilon_{\max} = \varepsilon_m \frac{1+2\varphi f_{cm}}{1-2\varphi f_{cm}} \quad (2-2)$$

که در آن  $\varepsilon_m$  و  $\varepsilon_{\max}$  گذردهی برای محیط معلق و سلول است  $\varphi$  جرمی است که بصورت نسبت حجم سلول به ناحیه تشخیص تعریف می‌شود و  $f_{cm}$  فاکتور کلوزیوس-موسوتی می‌باشد که بصورت زیر محاسبه می‌شود

$$f_{cm} = \frac{\varepsilon_c - \varepsilon_m}{\varepsilon_c + \varepsilon_m} \quad (3-2)$$

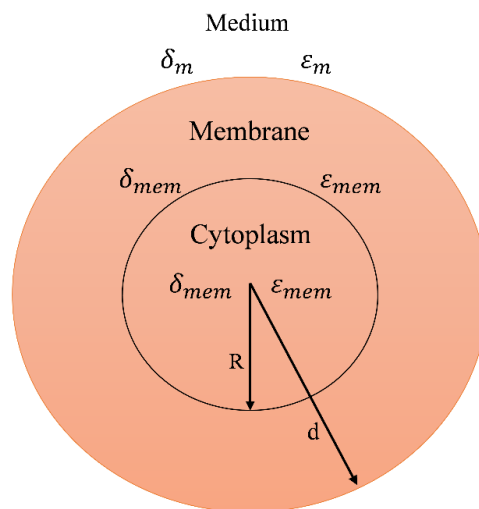
$\epsilon_m$  ضریب گذردهی محیط و  $\epsilon_c$  ضریب گذردهی مختلط ذره است که برای یک سلول منفرد بصورت

زیر محاسبه می‌شود

$$\epsilon_c = \epsilon_{mem} \frac{\rho^3 + 2 \left( \frac{\epsilon_i - \epsilon_m}{\epsilon_i + 2\epsilon_m} \right)}{\rho^3 - \left( \frac{\epsilon_i - \epsilon_m}{\epsilon_i + 2\epsilon_m} \right)} \quad (4-2)$$

$$\rho = \frac{R}{R-d} \quad (2-5)$$

که در معادله ۲-۴  $\epsilon_m$  و  $\epsilon_i$  و  $\epsilon_{mem}$  گذردهی غشا سلولی و سیتوپلاسمی و  $d$  و  $R$  شعاع و ضخامت سلول می‌باشد.



شکل ۲-۴: مدل دولایه سلولی همان طور که در شکل پیداست  $\epsilon_m$  و  $\epsilon_{mem}$  و  $\epsilon_i$  بیانگر نفوذ پذیری می‌باشد و  $\sigma_m$  و  $\sigma_{mem}$  و  $\sigma_i$  بیانگر رسانایی محیط می‌باشد [۴۳]

در ادامه  $C_{mix}$  که به نام خازن مختلط می‌باشد بصورت زیر محاسبه می‌شود

$$C_{mix} = \epsilon_{max} \frac{s}{4\pi kd} \quad (6-2)$$

که در معادله ۶-۱،  $S$  مساحت سلول  $k$  ثابت ژئومتري می‌باشد که از نسبت رسانایی سلول به محیط بدست می‌آید و سپس امپدانس مختلط سلول به صورت زیر محاسبه می‌شود

$$Z_{img} = \frac{1}{j\omega C_{mix}} \quad (7-2)$$

و در نهایت امپدانس کل سلول به صورت زیر محاسبه می‌گردد [۴۴].

$$Z = \sqrt{z_{re}^2 + z_{img}^2} \quad (8-2)$$

## ۸-۲ نیروهای دی الکتروفورسیس و الکتروفورسیس

به حرکت جهت دار ذرات باردار درون میدان الکتریکی الکتروفورسیس گویند. به طور حتمی تمام سلول‌ها خنثی هستند و نمی‌توانیم تحت تاثیر نیروی الکتروفورسیس جداسازی و شناسایی سلول‌های سرطانی را انجام دهیم نشانگرهای زیستی مانند آگزوزوم‌ها و دئوکسی نئوکلیک اسیدها به طور زیستی باردار هستند و می‌توان با قرار دادن آنها تحت تاثیر نیروی الکتروفورسیس به شناسایی و جداسازی آنها پردازیم. یکی از معایب روش الکتروفورسیس نسبت به دیگر روش‌ها استفاده از ذرات باردار می‌باشد که در خون بسیار نادر هستند در نتیجه بازدهی شناسایی و جداسازی کمتری نسبت به دیگر روش‌ها را دارند.

پدیده دی الکتروفورسیس به حرکت جهت دار ذرات خنثی درون میدان الکتریکی گویند و در این روش لزومی بر باردار بودن ذرات نیست. در نتیجه می‌توان تعداد زیادی از ذرات تشکیل دهنده خون را مورد بررسی قرار داد. اما نیروی جا به جا کننده ذرات به عواملی مانند میدان الکتریکی، ابعاد ذرات خنثی، خصوصیات الکتریکی ذرات و فرکانس اعمالی بستگی دارد [۴۵].

این نیرو حرکتی را توصیف می‌کند که به واسطه قطبی شدن یک ذره خنثی درون میدان الکتریکی غیریکنواخت ایجاد شده‌است، نیروی دی الکتروفورسیس وارد شده بر یک ذره کروی خنثی که قابلیت قطبی شدن را داشته باشد و در محیط رسانا قرار گرفته باشد از معادله ۹-۲ بدست می‌آید

$$f_{DEP} = 2\pi r^3 \epsilon_m R_e [f_{cm}] \nabla E^2 \quad (9-2)$$

که در این معادله  $r$  شعاع ذره،  $\epsilon_m$  ضریب گذردهی ذره،  $\nabla E$  میدان الکتریکی،  $R_e[f_{cm}]$  قسمت حقیقی عامل کلازیوس-ماستی می باشد که در معادله ۲-۱۰ بدست می آید

$$f_{cm} = \frac{\epsilon_{eq} - \epsilon_m}{\epsilon_{eq} + 2\epsilon_m} \quad (10-2)$$

که  $\epsilon_m$  ضریب گذردهی و  $\epsilon_{eq}$  جایگزین ضریب گذردهی مختلط می باشد در این مطالعه از ویژگی مدل تک پوسته جهت محاسبه نیروهای دی الکترو فروسیس اعمال شده بروی سلول ها استفاده می شود زیرا با در نظر گرفتن لایه خارجی سلول ها این مدل محاسبه دقیقی را ارائه می کند و مقدار  $\epsilon_{eq}$  براساس معادله ۲-۱۱ محاسبه میگردد

$$\epsilon_{eq} = \frac{d^3 + 2 \left( \frac{\epsilon_n - \epsilon_s}{\epsilon_n + 2\epsilon_s} \right)}{d^3 - \left( \frac{\epsilon_n - \epsilon_s}{\epsilon_n + 2\epsilon_s} \right)} \quad (11-2)$$

که  $\epsilon_n$  ضریب گذردهی هسته و  $\epsilon_s$  ضریب گذردهی پوسته می باشد و مقدار  $d$  از معادله ۱۲-۲ بدست می آید

$$d = \frac{r_o}{r_i} \quad (12-2)$$

که  $r_o$  شعاع خارجی پوسته و  $r_i$  شعاع داخلی پوسته می باشد.

## ۹-۲ نیروی پسا

زمانی که یک ذره کروی کوچک در معرض نیروی دی الکترو فروسیس قرار گرفته و با سرعت  $v$  در حال حرکت در محیط سیال می باشد در همین لحظه این ذره در معرض یک نیروی مقاوم از جانب سیال قرار می گیرد این نیروی مقاوم را نیرو پسا می نامند و با معادله ۲-۱۳ قابل محاسبه می باشد

$$F_D = 6\pi\mu v \quad (13-2)$$

که در این معادله  $v$  سرعت سیال و  $\mu$  ویسکوزیته می باشد نیروی حاکم برروی سلول خونی که تحت تاثیر نیروی پسا و تحت تاثیر نیروی دی الکترو فروسیس است به صورت معادله ۲-۱۴ محاسبه می گردد.

$$F_{total} = F_{DEP} - F_D$$

(14-2)

# فصل سوم: مروری بر پژوهش‌های

پیشین

### ۳-۱ مقدمه

در این فصل ابتدا تاریخچه پیدایش میکروفلوئیدیک مورد بررسی قرار می‌گیرد. در ادامه روش‌های جداسازی سلول سرطانی بدون استفاده از میکروفلوئیدیک و با استفاده از میکروفلوئیدیک غیرفعال به روش‌های نیروی گریز از مرکز و فیلتراسیون مورد بحث قرار می‌گیرد و در آخر روش‌های فعال جداسازی سلول‌های زیستی با روش الکتروفورسیس و دی الکتروفورسیس و فلوسایتومتری بررسی می‌شود.

### ۳-۲ روش‌های شناسایی و جداسازی بدون استفاده از دستگاه میکروفلوئیدیک

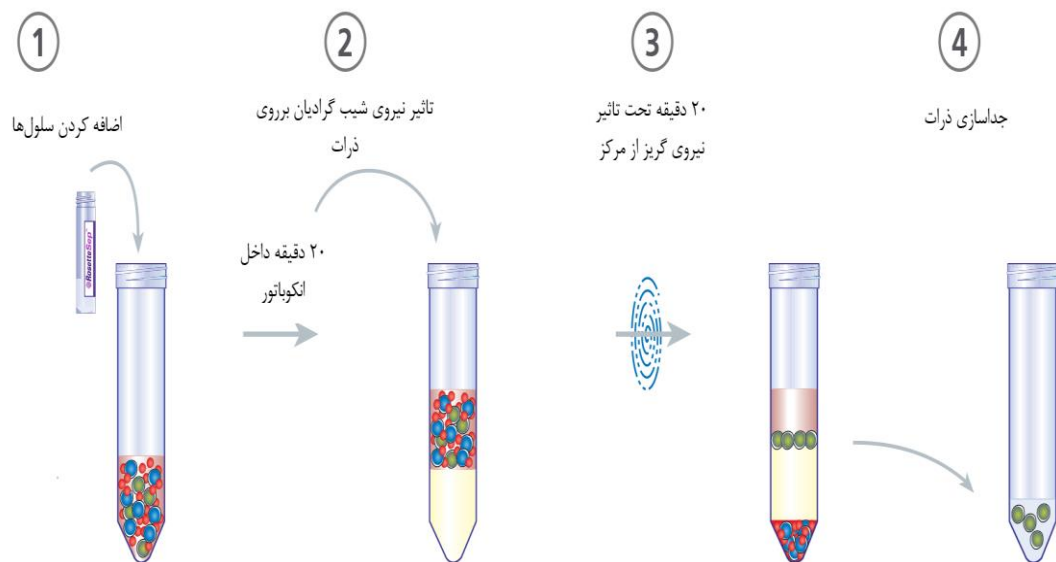
روش‌های غیر مبتنی بر میکروفلوئیدیک در گذشته به دلیل نبود امکانات و فن‌آورهای نوین بیشتر مرسوم بوده‌اند امروزه پس از ظهور دانش‌های نوین و جدید میکروفلوئیدیک جایگزین روش‌های قدیمی شده‌اند. این روش‌های قدیمی به دلیل سرعت کمتر، بازدهی پایین، کمتر استفاده می‌شوند ولی اهمیت خود را حفظ کرده‌اند. زیرا مدل‌های اصلاح شده‌ی آن‌ها در طرح‌های میکروفلوئیدیک جدید استفاده می‌شوند.

### ۳-۲-۱ روش سانتریفیوژ

روش سانتریفیوژ یک روش معمولی و آزمایشگاهی است سانتریفیوژ کردن برای جداسازی و شناسایی سلول‌های خون به کار می‌رود که مبنای کار در این روش تفاوت چگالی سلول‌های خون است.

در این روش ابتدا خون با محلول ضد انعقاد مخلوط می‌شود تا در مرحله‌ی جداسازی و شناسایی خون لخته نشود سپس خون به دستگاه سانتریفیوژ انتقال یافته و با سرعت معینی می‌چرخد. نیروی گریز از مرکز وارده به سلول که دارای چگالی بالایی هستند باعث می‌شود بیشتر از مرکز دوران فاصله بگیرند و در نتیجه گلبول‌های قرمز که دارای چگالی بالایی هستند در پایین لوله قرار می‌گیرند و به ترتیب گلبول‌های سفید و پلاسما بر روی آن قرار می‌گیرند.

یکی از بهترین روش‌های جداسازی و شناسایی سلول‌های خونی روش فیکول است. در این روش بعد از انجام عمل سانتریفیوژ گلبول‌های قرمز ته‌نشین می‌شوند در حالی که سلول‌های هسته‌دار به صورت حلقه‌ای روی گلبول‌های قرمز قرار می‌گیرند همچنین پلاسما در بالاترین جایگاه قرار می‌گیرد لازم به ذکر است که روش سانتریفیوژ به دلیل چرخش زیاد تنشی بر سلول‌ها وارد می‌کند که می‌تواند تغییر در خواص سلول‌ها ایجاد کند [۴۶].



شکل ۳-۱: روش سانتریفیوژ برای شناسایی و جداسازی سلول‌ها [۴۷]

### ۳-۲-۲ استفاده از فیلتر غشایی

تفکیک سلول‌ها براساس اندازه و تغییر شکل پذیری آن‌ها با توجه به قابل مشاهده بودن و کنترل راحت فرایند از قدیمی‌ترین و رایج‌ترین شیوه جداسازی است که یکی از این روش‌ها فیلتر کردن است. فیلترهای غشایی یکی از با دقت‌ترین نمونه‌های فیلتر هستند. مشکل اساسی فیلترهای غشایی انسداد آن‌ها و عدم قابلیت بازیابی سلول‌ها بعد از فیلتر شدن است.

این روش کاربرد کمتری نسبت به روش سانتریفیوژ دارد. همانند روش سانتریفیوژ ابتدا خون با محلول ضدانعقاد مخلوط می‌شود تا در چار لختگی نشود و سپس خون رقیق شده از غشا عبور می‌کند این فیلتر غشایی باعث می‌شود که سلول‌های بزرگتر به دام بیفتند و سلول‌های کوچکتر به راه خود ادامه داده و جدا می‌شوند [۴۸].

### ۳-۳ روش‌های شناسایی و جداسازی با استفاده از دستگاه میکروفلوئیدیک

پس از ظهور میکروفلوئیدیک روش‌های قبلی به دلیل پرهزینه بودن و بازده پایین و دقت نامناسب کنار گذاشته شده‌اند هرچند که روش‌های میکروفلوئیدیک نیز عمدتاً از روش‌های قبلی سرچشمه می‌گیرند در ادامه پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه مورد بررسی قرار می‌گیرد.

هنگامی که سیگر و سیلبرگر<sup>۱</sup> در سال ۱۹۶۱ شاهد وجود ذرات در جریان آرام لوله بودند، ذرات در یک طوقه در لوله جمع شده بودند، دانشمندان گیج شده بودند و سال‌ها وقت صرف یاد گرفتن که چرا چنین رفتاری رخ داده است و نهایتاً درک کردن که آن‌ها توسط نیروی ناشناخته‌ی قبلی بروی ذرات در جریان ساکن ایجاد شده است. آزمایش آن‌ها با استفاده از یک لوله استوانه‌ای به قطر ۱ سانتی متر که ذراتی به قطر ۱ میلی متر با یک طوقه به شعاع متوسط ۰/۶ سانتی متر، که ذرات بین لوله مرکزی و دیواره لوله حرکت می‌کنند. این اثر به عنوان تنگش لوله شناخته می‌شود [۲۹].

کشف اثر گرفتگی لوله تلاش‌های نظریه پردازان زیادی را برانگیخت تا این حرکت را توضیح دهند زیرا نظریه‌های آن زمان برای حرکت جانبی ذرات نتوانستند نتایج تجربی را توضیح دهند. یکی از این نظریه‌ها توسط روبینو کلوکلر<sup>۲</sup> در سال ۱۹۶۱ پیشنهاد شد، توضیح نظری بر روی نیروی مگنوس ارائه

---

<sup>1</sup> Silberger

<sup>2</sup> Rubino Clocler

کرده بود. این آزمایش بر روی یک جسم چرخان در یک جریان یک نواخت بود اما نتوانست نظریه سیگر و سیلبرگر را توضیح دهد زیرا همیشه نیروی مگنوس همیشه به سمت مرکز لوله هدایت می شود [۳۰].

دو پیشرفت عمده از زمان‌های تلاش‌های اولیه برای توضیح نتایج سیگر و سیلبرگر به توسعه درک فعلی از میکروفلوئیدیک کمک کرده است در سال ۱۹۶۵ سافمن<sup>۱</sup> یک نیروی نظری مستقل از چرخش ذره و تنها به دلیل تفاوت در سرعت سیال در دو طرفه یک ذره در یک جریان برشی خطی پیشنهاد کرد همچنین مشخص شد که این نیرو به اختلاف بین ذره و پروفیل سرعت دست نخورده در همان داخل به جریان وابسته است [۳۱].

دومین نقش مهم در مطالعه تمرکز ساکن در اواسط ۱۹۷۰ زمانی رخ داد که هوتتل و واسور مک کوکس<sup>۲</sup> تکنیک‌های تحلیلی مشابه‌ای برای جریان‌های درجه دوم به کار بردند و نیرویی را یافتند که به سمت دیواره‌ای یک کانال متناسب با تغییر در نرخ برش بود. این نیروی بالابرنده شیب برشی همراه با نیروی دافعه القا شده توسط دیوار به درستی نظریه تعادلی سیگر و سیلبرگر را پیش بینی کرد [۳۲].

شاید مهم‌ترین پیشرفت تمرکز داخلی با توسعه میکروسیال‌ها نتایج جالب ارائه شده توسط مکانیک سیالات بوده است. اولین نتایج بدست آمده در یک معماری میکروفلوئیدیک با یک کانال راست خطی در سال ۲۰۰۷ توسط دی کارلو<sup>۳</sup> و همکاران بدست آمد نتایج اولیه حاصل از این آزمایش تعمیم و تحلیل سیگر و سیلبرگر به مقاطع مستطیلی بود با این نتیجه گیری باید عدد رینولدز ذرات تقریباً برابر یا برگتر از ۱ باشد [۳۳].

گسترش ساخت دستگاه میکروفلوئیدیک تا حد زیادی توسط روش‌هایی مانند لیتوگرافی نرم تسهیل شده است که طراحی و ساخت سریع نمونه اولیه دستگاه‌های میکروفلوئیدیک را با استفاده از انواع مواد

---

<sup>1</sup> Safman

<sup>2</sup> Washer McCooks

<sup>3</sup> Di Carlo

ممکن می‌سازد. اگرچه این سیستم‌های میکروفلوئیدیک هنوز در حال توسعه هستند اما این قابلیت را دارند که به طور گسترده مورد استفاده قرار گیرند زیرا آنها اقتصادی و قابل تکرار هستند و می‌توانند با دیگر فناوری‌ها اقدام شوند [۳۵].

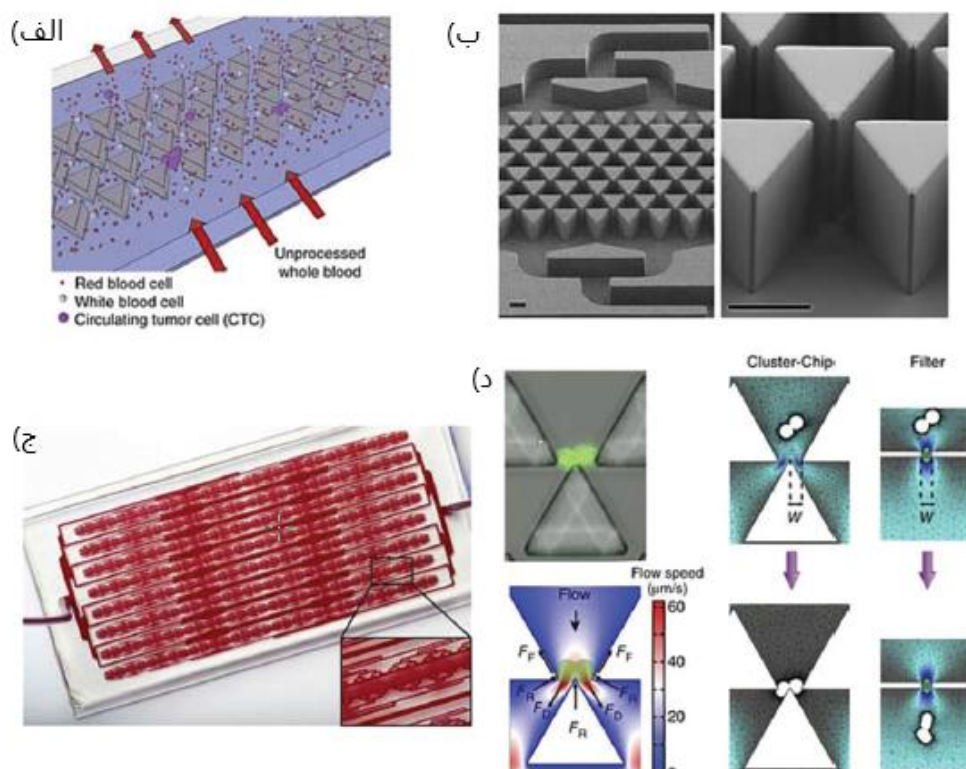
### ۳-۳-۱ دستگاه‌های میکروفلوئیدیک غیرفعال

تکنیک غیرفعال تکنیکی است که ذرات با جریان ثابتی در حرکت هستند و هیچ‌گونه نیروی خارجی به آنها اعمال نمی‌شود و بر اساس اندازه یا نیروی اینرسی، ذرات جداسازی یا شناسایی می‌شوند.

### ۳-۳-۱-۱ شناسایی و جداسازی به روش میکروفیلتراسیون

سلول‌های سرطانی از دیگر سلول‌های خون مانند گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز خون بزرگتر و دارای تنش سطحی بیشتری هستند همین تفاوت‌های فیزیکی به دانشمندان کمک کرده‌است تا روش‌های مختلفی برای شناسایی و جداسازی به کمک فیلتر کردن سلول‌های خون ابداع نمایند.

در یک بررسی، یک سیستم میکروفلوئیدیک برای شناسایی و جداسازی سلول‌های سرطانی سینه از نمونه خون رقیق شده ارائه شده‌است. این دستگاه با دو لایه غشا پارلین با شکاف و منافذ (فیلتر) بسیار دقیق ساخته شده‌است تا بتواند سلول‌های سرطانی را به دام بیاورد. این دستگاه در تجزیه و تحلیل‌های ساده بکار گرفته می‌شود و نتایج آزمایشگاهی نشان داده‌است که این دستگاه می‌تواند ۱ میلی لیتر خون را در زمان ۵ دقیقه غنی سازی کند [۴۸].



شکل ۳-۲: دستگاه میکروفلوئیدیک مبتنی بر فیلتراسیون [۵۰]

همان طور که در شکل ۳-۲ پیدا است عملکرد دستگاه به این صورت است که در قسمت الف بارگذاری قسمتی از خون که فراوری نشده است را نشان می‌دهد در قسمت ب آرایه‌های مثلی شکل برای فیلتر کردن مشخص است و در قسمت ج یک خوشه از سلول سرطان سینه قبل از عمل شناسایی و جداسازی مشخص شده است و در قسمت آخر عمل جداسازی به نمایش گذاشته شده است [۵۰].

در پژوهشی دیگر با استفاده از یک دستگاه میکروچاپ توانسته‌اند سلول‌های سرطانی سینه و سلول‌های سرطانی روده بزرگ را جداسازی کنند این میکروفلوئیدیک دارای یک پیش تصویه و چندین آرایه هلالی شکل است این دستگاه با موفقیت جداسازی را با راندمان ۸۰٪ در حجم ۱ میلی لیتر خون بدست آورده است [۵۰].

دستگاه دیگری برای جداسازی و شناسایی سلول‌های توموری گردشی معرفی شده است این دستگاه میکروفلوئیدیک مارپیچی جدید دارای یک شکل مقطع دوزنقه‌ای است که هسته‌ی این دستگاه برای

بازده بیشتر تغییر کرده است اجزای کوچکتر تشکیل دهنده‌ی خون در گرداب‌هایی به سمت دیواره‌های کانال بیرونی محصور شده و در نهایت در خروجی جدا می‌شوند در حالی که سلول‌های توموری گردشی بزرگتر در نزدیک دیواره کانال داخلی جمع می‌شوند. بازده این آزمایش از سلول سرطانی سینه در ۸ دقیقه نزدیک به ۸۰٪ بدست آمده است [۵۱].

### ۳-۱-۲ شناسایی و جداسازی به روش نیروی اینرسی

این دستگاه‌ها با استفاده از نیروهای بالابر ناشی از دیواره، گرادیان برش، اینرسی و نیروی کششی دین<sup>۱</sup> برای شناسایی و جداسازی سلول‌های توموری سرطانی کار می‌کنند. این دستگاه‌ها با استفاده از نیروی‌های گردابی که درون میکروفلوئیدیک ایجاد می‌شود موفق به شناسایی و جداسازی سلول می‌شوند.

نیروی بالابر ناشی از دیواره، باعث دوران ذرات کروی می‌شود همچنین علاوه با برهم خوردن جریان اطراف ذره در کنار دیواره، نیروی خالص وارد بر ذره نزدیک دیواره‌ها با نیروی خالص وارد بر ذره واقع در جریان نامحدود خواهد بود.

نیروی بالابر گرادیان، اگر پروفایل توزیع سرعت جریان خمیده نباشد جریان ساده برشی خواهیم داشت در این حالت فشار نزدیک دیواره‌ها بیشتر از فشار در مرکز بوده و ذرات از دیواره‌ها به مرکز رانده می‌شوند اما در واقعیت بزرگی سرعت نسبی سیال به ذره در قسمت جهت مخالف بسیار بیشتر از سرعت نسبی سیال در قسمت موافق جریان است [۵۲].

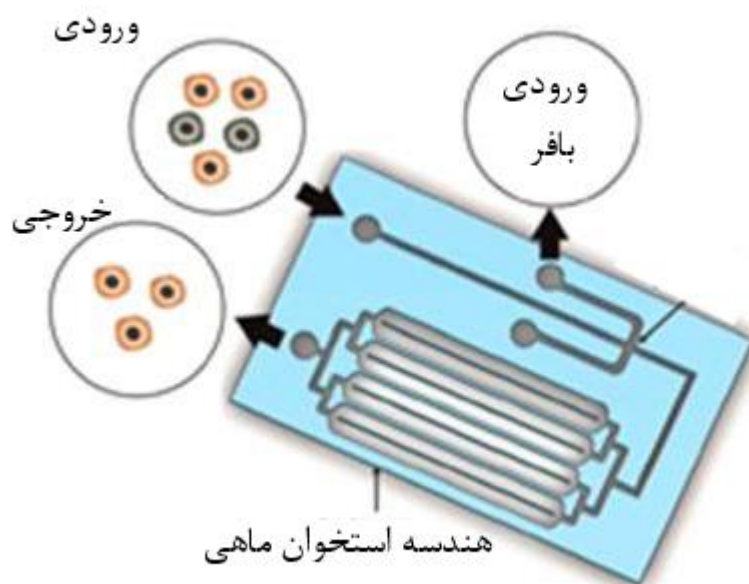
دومین نیروی تعیین کننده در این دستگاه‌ها نیروی کششی دین است ذرات در هنگام ورود به کانال خمیده یا کانال‌هایی که دارای تغییرات ناگهانی سطح مقطع هستند تحت تاثیر جریان ثانویه قرار

---

<sup>1</sup> Dyne

می‌گیرند. در نتیجه‌ی ایجاد این جریان‌ها اجزای سیال نزدیک به مرکز کانال تکانه‌ی بیشتر از اجزا مجاوره دیواره تحمل می‌کنند [۵۳].

هندسه‌ی استخوان ماهی<sup>۱</sup> در ابتدا برای متمرکز سازی ذرات مطرح شده‌است حرکت نامنظم جریان در اثر تغییر مداوم جهت موجب ایجاد گرداب‌هایی متعدد و جریان حلزونی شکل می‌شود. در یک بررسی اخیرا وانگ و همکاران از این طرح برای جداسازی سلول‌های توموری در گردش استفاده کرده‌اند به این صورت که سطوح کانال‌ها با آنتی بادی پوشش داده می‌شود و سلول‌های سرطانی در اثر عبور از محل مشخص به آنتی بادی‌های می‌چسبند و شناسایی و جداسازی انجام می‌شود [۵۴ و ۵۵].



شکل ۳-۳: دستگاه میکروفلوئیدیک با هندسه استخوان ماهی [۵۵]

با این حال مشکل عمده این دستگاه گرفتگی کانال در هنگام استفاده از حجم زیاد است برای رفع این مشکل از یک دستگاه متشکل از سه قسمت که شامل بارگذاری، جداسازی و ذخیره سازی نمونه معرفی گردیده است. خون در ابتدا بارگذاری می‌شود و به آرامی در داخل محفظه تصویه قرار می‌گیرد

<sup>1</sup> Herringbone-chip

که در آن خون به صورت شعاعی به بیرون چرخانده می‌شود و سلول‌های بزرگتر از کوچکتر جدا شده و به محفظه ذخیره منتقل می‌شود این دستگاه بازدهی را در ۲۰ میلی لیتر خون تا ۹۶ درصد افزایش داده است [۵۶].

علاوه بر این دستگاه سامانه‌ای با مکانیسم تله سلولی قابل تنظیم معرفی شده است که از یک ساختار دو لایه تشکیل شده است در لایه اول پلی متی سیلوکسان بالایی به عنوان کانال جریان سیال کار می‌کند در حالی که دیگری به عنوان کانال کنترلی پر از نمونه استفاده می‌شود این دو لایه توسط یک دیافراگم انعطاف پذیر پنامایی کنترلی می‌شود که منقبض و یا منبسط می‌شوند در آزمایش انجام شده بازده ۸۲٪ از ۷ میلی لیتر خون بدست آمده است [۵۷ و ۵۸].

### ۳-۴-۲ دستگاه‌های میکروفلوئیدیک فعال

تکنیک فعال تکنیکی است که ذرات در یک جریان نسبتاً یکنواخت حرکت می‌کنند و سپس یک میدان خارجی مانند میدان الکتریکی یا مغناطیسی به ذرات اعمال می‌شود که باعث جدایی و شناسایی ذرات براساس خواص آن‌ها می‌شود.

### ۳-۴-۲-۱ دی‌الکتروفورسیس با منبع جریان الکتریکی غیرمستقیم

از جمله روش‌های ایده‌آل و پرکاربرد در مبحث شناسایی و جداسازی سلول‌های زیستی دی - الکتروفورسیس می‌باشد این روش به صورت گسترده در آزمایشگاه‌های تخصصی پزشکی و تحقیقاتی جهت تشخیص بیماری معالجه بیماران و تحقیق در زمینه داروسازی به کار می‌رود. سلول‌های زیستی از نظر الکتریکی خنثی هستند که تحت تاثیر میدان الکتریکی پلاریزه شده و تبدیل به دو قطبی

---

<sup>1</sup> Resettable cell traps

الکتریکی می‌شوند که اگر نیروی دی‌الکتروفورسیس وارد بر سلول بر نیروی وارده به سلول از طرف محلول غلبه کند می‌تواند تحت تاثیر میدان الکتریکی در جهت یا خلاف جهت میدان به حرکت درآیند.

اگر ذره در جهت میدان الکتریکی ماکزیمم حرکت کند به این پدیده دی‌الکتروفورسیس مثبت و نیروی وارده را دی‌الکتروفورسیس مثبت می‌نامند و اگر ذره در خلاف جهت میدان الکتریکی ماکزیمم حرکت کند به این پدیده دی‌الکتروفورسیس منفی و نیروی وارده را دی‌الکتروفورسیس منفی می‌نامند. در این روش برای ایجاد میدان الکتریکی از جریان متناوب در طیف وسیع فرکانسی استفاده می‌شود در این حالت نیروی دی‌الکتروفورسیس وارد بر ذره علاوه بر ویژگی‌های الکتریکی ذاتی و اندازه ذره به فرکانس میدان الکتریکی اعمالی و ویژگی‌های الکتریکی محیط اطراف ذره بستگی دارد.

فاکتور  $R_e$  در حالت جریان متناوب از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است زیرا این نشانگر قابلیت پلاریزه شونده ذرات را نشان می‌دهد و تابعی از میدان الکتریکی اعمالی و خواص دی‌الکتریک ذره و محیط است [۵۸].

در یک بررسی جدید یک روش شناسایی مبتنی بر دی‌الکتروفورسیس ناشی از نور پس از یک فرایند فیلتراسیون غشایی و اندازه اولیه به وسیله میکروفلوئیدیک برای شناسایی تومورها مورد استفاده قرار گرفته‌است. این دستگاه از یک لایه پلی متیل متاکریلا<sup>۱</sup> و یک لایه شیشه‌ای قلع اکسید ایندیم، یک لایه چسب و یک لایه مواد فتوشاتکی با روکش نانو ذرات اکسید تیتانیوم<sup>۲</sup> رسانا ساخته شده‌است.

با استفاده از جریان متناوب بین دو لایه شیشه‌ای یک میدان غیریکنواخت را ایجاد می‌کنند علاوه بر این از یک پروژکتور به عنوان منبع روشن کننده نور مورد استفاده قرار می‌گیرد که این امر موجب تحریک جفت الکترون و حفره شده و باعث ایجاد چهار منطقه غیریکنواخت همراه با افت ولتاژ قابل

---

<sup>1</sup> Polymethyl methacrylate

<sup>2</sup> Titanium dioxide

توجه در محلول می‌شود. بنابراین در شرایط مطلوب با اعمال ولتاژ ۵ ولتی به اوج میدان اعمال شده در ۱۰۰ کیلوهرتز می‌رسد که این روش توانایی خود را در شناسایی سلول‌های سرطانی با خلوص ۹۵٪ نشان داده است [۵۹]. پومر و همکاران به منظور جداسازی پلاکت‌ها از نمونه کامل خون یک دستگاه میکروفلوئیدیک دو مرحله‌ای طراحی کرده‌اند که این دستگاه جهت جداسازی ذرات مورد نظر از اختلاف ولتاژ نسبتاً زیاد ۱۰۰ ولت در فرکانس ۱ مگاهرتز استفاده شده است. در این پژوهش تعداد پلاکت‌های جدا شده با افزایش میدان الکتریکی افزایش پیدا می‌کند [۶۰]. پارک و همکاران اثرات سرعت ورودی بافر روی راندمان جداسازی سلول‌ها در یک دستگاه میکروفلوئیدیک و با استفاده از نیروهای جاذبه و دافعه دی‌الکتروفورسیس مورد بررسی قرار دادند آن‌ها به این نتیجه رسیدند که با افزایش سرعت بافر نتیجه جداسازی کاهش می‌یابد [۶۱].

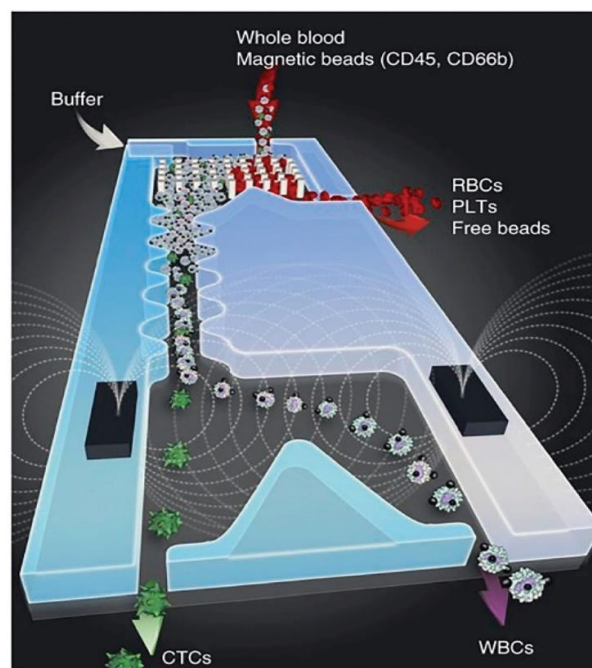
### ۳-۴-۲ دی‌الکتروفورسیس با منبع جریان الکتریکی مستقیم

در این روش از منبع جریان مستقیم ساده استفاده می‌شود. مزیت این روش ساختار ساده و قابلیت ساخت آسان با روش‌های ساده لیتوگرافی در آزمایشگاه است. در این روش میدان الکتریکی ایجاد شده توسط جریان مستقیم به الکترودها جهت فراهم کردن نیروی جنبشی لازم برای حرکت سلول‌ها جداسازی و تغییر مسیر حرکت آن‌ها استفاده می‌شود. می‌دانیم سلول‌ها همانند ذرات کروی محلول در محیط تحت تاثیر میدان غیر یکنواخت اعمالی و نیروی دی‌الکتروفورسیس به حرکت در می‌آیند. جداسازی با جریان مستقیم به دلیل نتایج مطلوب‌تر در بین روش‌های دیگر برای شناسایی سلول‌های توموری گردشی محبوب‌تر است.

در یک بررسی دستگاه میکروفلوئیدیک مبتنی بر میدان الکتریکی با جریان مستقیم پیشنهاد شده است. این دستگاه شامل دو بخش است در بخش اولی با استفاده از جا به جایی جانبی جداسازی سلول سرطانی از دیگر اجزا خون صورت می‌گیرد که این بخش خود شامل یک فیلتر و یک میکروفیلتر است

که قادر به جدا کردن ذرات با قطر ۴ میکرومتر می باشد و بخش دوم از جفت الکتروود برای ایجاد میدان الکتریکی استفاده می شود. در بخش اول پلاکت ها و سلول های دیگر از مسیر جدا می شوند و در ادامه سلول هایی که نشانه دار شده اند از مسیر منحرف نمی شوند و به قسمت انتهایی میکروفلوئیدیک می روند سپس نانو ذرات مغناطیسی و سلول های توموری گردشی به دلیل اختلاف نیروی مغناطیسی که دارند در قسمت های مختلف جا به جا می شوند.

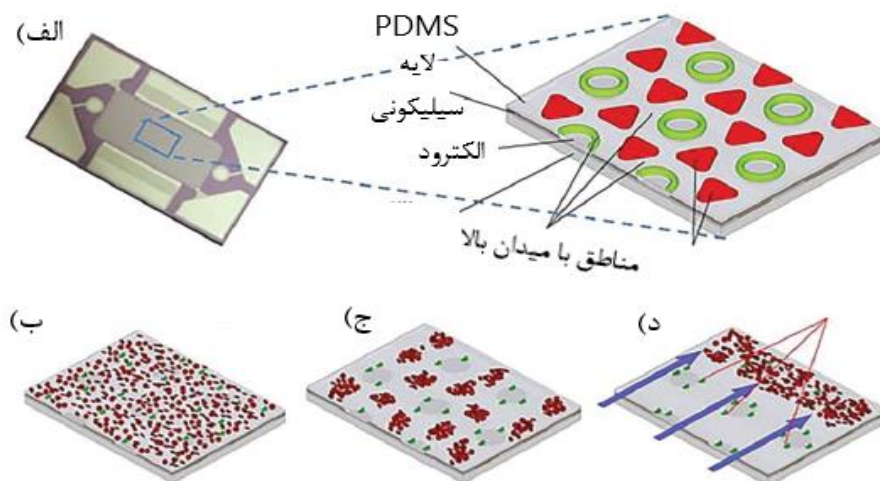
سلول های توموری گردشی در قسمت هایی که میدان مغناطیسی ضعیف تر است به دام می افتند و از نانو ذرات مغناطیسی جدا می شوند این آزمایش نشان داده است ۹۵٪ تومورها و ۷۹٪ نانو ذرات مغناطیسی توسط میکروفلوئیدیک مغناطیسی جدا شده اند [۶۲ و ۶۳].



شکل ۳-۴: دستگاه میکروفلوئیدیک CTC-iChip [۶۴]

در پژوهش دیگر یک دستگاه میکروفلوئیدیک مبتنی بر روش میدان الکتریکی با جریان مستقیم به منظور شناسایی و جداسازی سلول های آزاد اسید دئوکسی نئوکلیک معرفی گردیده است. این دستگاه می تواند اسید دئوکسی نئوکلیک آزاد را بدون هیچگونه غنی سازی یا آماده سازی اولیه استخراج کند

این دستگاه از یک کانال برای تجمع خون و یک جفت الکتروود به منظور ایجاد میدان مغناطیسی که از یک منبع ۲۰ ولتی جریان مستقیم تغذیه می‌کند ساخته شده است.



شکل ۳-۵: عملکرد دستگاه شناسایی و جداسازی سلول‌های آزاد اسید دئوکسی نئوکلیک [۶۶].

همان‌گونه که در شکل ۳-۵ پیدا است روش عملکرد دستگاه به این صورت است که، در قسمت الف نمای کلی از دستگاه میکروفلوئیدیک مشخص است. در قسمت ب گلبول‌های خون با رنگ قرمز و سلول‌های آزاد اسید دئوکسی نئوکلیک با رنگ سبز مشخص شده‌اند، در قسمت ج با استفاده از میدان الکتریکی ایجاد شده که باعث جداسازی و جذب سلول‌های آزاد اسید دئوکسی نئوکلیک به الکتروود می‌شود مشخص است و در قسمت آخر دیگر اجزا خون تخلیه می‌شوند [۶۴].

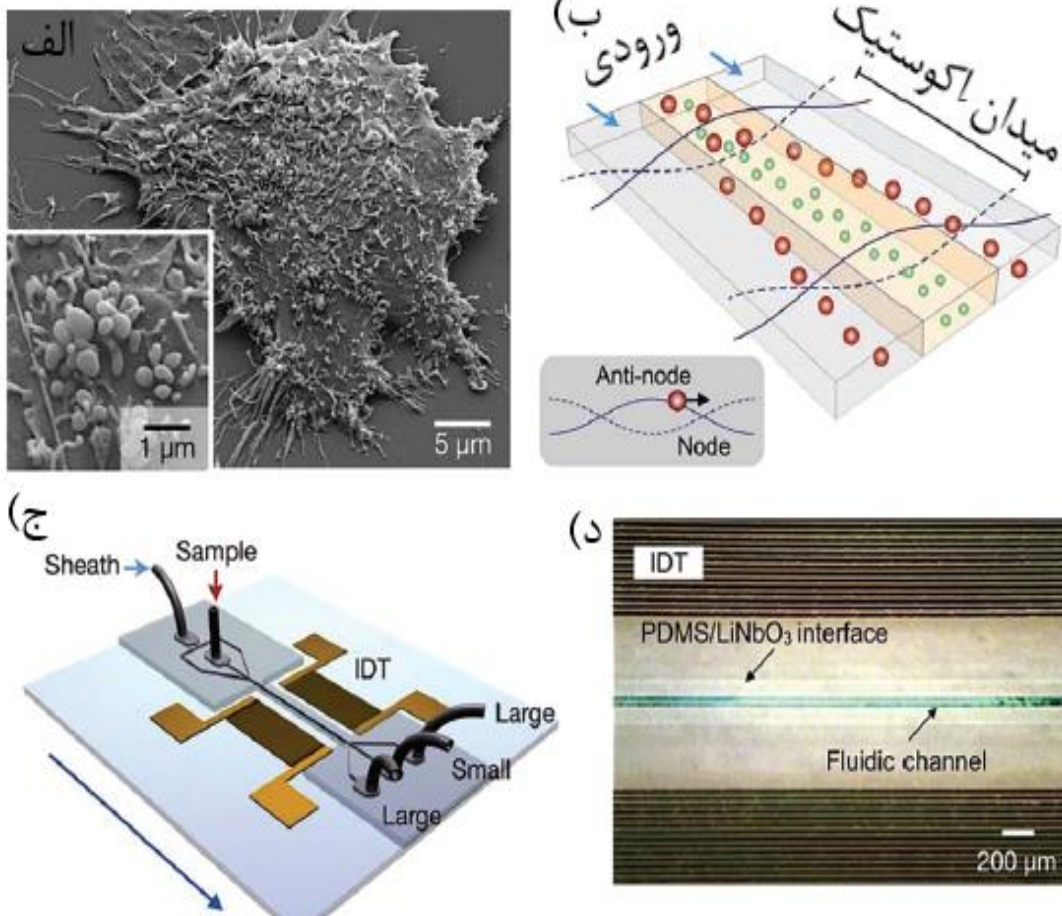
### ۳-۲-۴-۳ شناسایی و جداسازی به روش امواج صوتی

حرکت یا ارتعاش یک شی صوت ایجاد می‌کند با حرکت یک شی مولکول‌های هوای مقابل آن فشرده می‌شوند این ملکول‌ها به ملکول‌های اطراف خود فشار وارد می‌کنند و دوباره به جای خود برمی‌گردند حرکت ناچیز مولکول‌های هوا موجی از تغییرات فشار ایجاد می‌کنند که به این موج صوت می‌گویند که امروزه در بسیاری از فن‌آوری‌های جدید از مزایا و ویژگی‌های امواج صوتی بهره می‌گیرند.

وقتی صوت در سازه‌ها و هندسه‌هایی با ابعاد بسیار کوچک پخش می‌شود به دلیل تلفات ناشی از ویسکوزیته و تلفات ناشی از حرارت امواج صوتی تضعیف می‌شوند این تلفات عمدتاً در مرز آکوستیک هیدوردینامیکی و حرارتی در نزدیک دیواره‌ها اتفاق می‌افتد که باید در بحث طراحی مورد توجه ویژه قرار گیرد [۶۷].

در یک بررسی دستگاه میکروفلوئیدیک مبتنی بر صوت ارائه شده است که ساختار آن شامل یک لایه پایه سیلیکون الکترودهای پلاتینی و یک لایه دی اکسید سیلیکون است لایه دی اکسید سیلیکون و الکترودها منطقه پر قدرت دی الکتریک را تشکیل می‌دهند که فقط ملکول‌های نانوذرات و سلول‌های بزرگتر را به خود جذب می‌کند در این آزمایش از یک نمونه پلاسما برای شناسایی آگزوم‌های آن با اعمال ولتاژ AC از ۱۰ ولت در فرکانس ۱۵ کیلوهرتز استفاده شده است پس از آن آنتی بادی‌ها ضد فلورنس CD65 و TSG101 برای تعیین کمیت آگزوم‌ها استفاده شده‌اند و این آزمایش به مدت زمان ۳۰ دقیقه با بازدهی ۸۰٪ به انجام رسیده است [۶۸].

در یک بررسی دیگر یک سیستم نانو فیلتراسیون صوتی که به طور مداوم ۱ میلی لیتر از نمونه گلبول قرمز خون را فیلتر می‌کنند تا آگزوم‌ها را از سایر محتویات خون جداسازی کند معرفی می‌گردد. آگزوم‌ها در یک زمینه آکوستیک نیروی پرتوی بالاتری را تجربه می‌کنند و به سمت گره‌های پرفشار آکوستیک حرکت می‌کنند در حالی که ذرات کوچکتر در مرکز نگهداری می‌شوند. این دستگاه توانسته بازده ۸۲٪ برای آگزوم‌های معلق در محیط کشت سلولی بدست بیاورد.



شکل ۳-۶: سیستم فیلتراسیون صوتی [۷۰]

همانطور که در شکل ۲-۴ پیدا است عملکرد دستگاه براساس فشار تابش آکوستیک است که به طور نسبی بر اساس اندازه ذرات شناسایی انجام می‌شود. دستگاه دارای یک الکتروود شانه‌ای است که در مرکز دستگاه کار گذاری شده است [۶۹ و ۷۰].

### ۳-۴-۳ شناسایی و جداسازی به روش سائتومتری ۳-۴-۱-۳ شناسایی به روش فلورسانس

روش فلورسانس برای بررسی و سنجش اجزای مختلف سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دستگاه اجزای متعدد سلول را معین کرده و می‌تواند آن‌ها را شمارش کند سلول‌های رنگ آمیزی و مرتب شده در کانال به صورت تک تک از مقابل پرتو عبور می‌کنند. در اثر تابش لیزر به سلول‌ها برحسب اندازه و

شکل آن‌ها سیگنال نوری حاصل می‌شود که به وسیله‌ی تقویت کننده‌های نوری به سیگنال‌های الکتریکی تبدیل می‌شود [۷۱].

فلورسانس‌ها امروزه از دستگاه‌های پیچیده‌ای که شامل قسمت‌های اپتیک، الکترونیک، کامپیوتر هستند ساخته می‌شوند دریافت و تشخیص این سیگنال‌ها به کمک آشکارسازها انجام می‌پذیرد، در سال ۱۹۳۰ آزمایش اندرو مالداوان<sup>۱</sup> منجر به ساخت دستگاهی با استفاده از سلول‌های فتوالکتریک شد که سلول‌های در حال عبور از میانه لوله‌ای به ابعاد میکرو یا نانو را شمارش می‌کرد اولین مقاله مربوط به فلوسیتومتری به سال ۱۹۳۴ بر می‌گردد که توسط اندرو مالداوان به چاپ رسید [۷۱ و ۷۲].

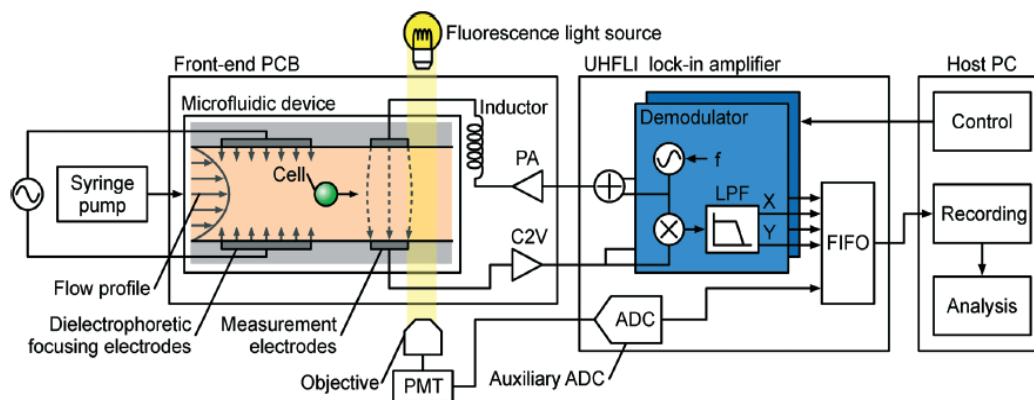
در یک بررسی که توسط هان<sup>۲</sup> و همکارانش انجام شده است از یک دستگاه میکروفلوئیدیک سایتومتری استفاده می‌کردند، در این دستگاه یک تقویت کننده را با میکروفلوئیدیک ترکیب کردند. تقویت کننده داخل دستگاه میکروفلوئیدیک با استفاده از تقویت کننده قدرت و مبدل جریان به ولتاژ نصب شده بر روی مدار چاپی به هم متصل می‌شوند و تقویت کننده خود شامل چند دمدولاتور می‌شود که اجازه می‌دهد چندین فرکانس مستقل تولید کنند و به صورت موازی تحلیل می‌شوند [۷۳ و ۷۴].

دستگاه میکروفلوئیدیک دارای مجموعه‌ای از الکترودهای موازی و همچنین تعدادی از الکترودهای متمرکز است. یک مدار تشدید با استفاده از یک سلف گسسته به صورت سری با امپدانس بین الکترودها شکل می‌گیرد که امپدانس این مدار رزونانسی سری بسیار زیاد است.

---

<sup>1</sup> Andrew Maldavan

<sup>2</sup> Han



شکل ۳-۷: شماتیک یک میکروفلوئیدیک سایتومتری (امپلی فایر مدار رزونانسی سری را ایجاد می کند که توسط سلف گسسته و امپدانس بین الکترودها اندازه گیری می شود) [۷۵]

به منظور افزایش اطلاعات بدست آمده از هر رویداد شناسایی فرکانس های چندگانه ای تولید و به صورت موازی تحلیل شده است دامنه ی هر فرکانس به دامنه ولتاژ محدود است که محرکه ی الکترودهای دستگاه هستند بنابراین استفاده از فرکانس های بیشتر به طور ذاتی منجر به کاهش سیگنال به نویز (SNR) می شود.

فرکانس ۹۰ MHz انتخاب شده است چون به فرکانس تشدید نزدیک تر است این سیگنال همچنین به عنوان سیگنال اولیه برای تشخیص تغییرات فازی استفاده می شود سیگنال های تنزل یافته به صورت موازی با نرخ ۱۰۰ نمونه در ۱ ثانیه ثبت شده اند که حداقل ۱۰ نقطه داده در هر رویداد را شناسایی کرده اند [۷۵ و ۷۶].

با استفاده از روش میکروفلوئیدیک سایتومتری می توان به تشخیص اسید نوکلئیک دست یافت در یک بررسی سینه و همکاران برای درک بهتر اهمیت بالینی اسید نوکلئیک به عنوان نشانگرهای سرطان جداسازی، تشخیص و تعیین مقدار اسید نوکلئیک های مرتبط بالینی از نمونه های بیماران مبتلا به سرطان سینه با استفاده از پلت فرم میکروفلوئیدیک سایتومتری دست یافته اند [۷۷].

جداسازی اولیه اسید نوکلئیک ها با استفاده از نشانگرهای تتراسین عمومی انجام شده است و سپس با تشخیص نشانگرهای خاص ویژه توموری اسید نوکلئیک ادامه یافت تشخیص براساس فلوسایتومتری

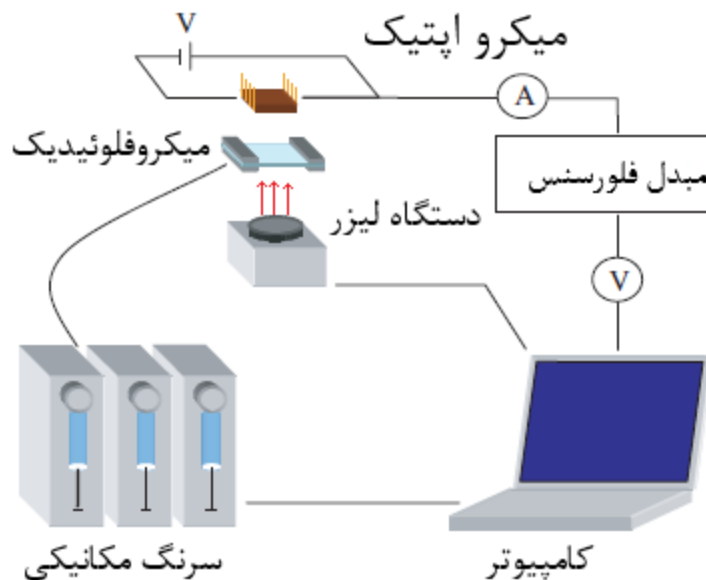
در جریان سیال متمرکز شده توسط یک پرتو لیزر انجام می‌شود که مقدار نور را به قطر اگزوم‌ها مرتبط کرده‌اند. این دستگاه توانسته شناسایی اگزوم‌های منفرد با قطر ۳۰۰ نانومتر با استفاده روش فلوسایتومتری با بازدهی ۹۰٪ بدست آورد. در یک بررسی دیگر از یک پروتوکل دقیق فلوسایتومتری در تشخیص اسید نئوکلیک‌ها با اندازه نانو استفاده کردند که در این روش که از یک مغناطیس سنج تجاری برای تحلیل کیفی و کمی اسید نئوکلیک‌های مشتق شده از سلول‌های منفرد با قطر ۱۰۰ نانومتر استفاده می‌کند [۷۹].

### ۳-۴-۲ شناسایی به روش امپدانس فلوسایتومتری

روش تحلیل امپدانس فلوسایتومتری به طور کامل در فصل اول توضیح داده شده‌است. خصوصیات الکتریکی غشای سلول و سیتوپلاسم و خصوصیات مکانیکی اسکلت سلولی خصوصیات کلی بیولوژیکی سلول را تعیین می‌کند. خصوصیات الکتریکی و مکانیکی سلول‌های منفرد برای فهم خصوصیات سلول اساسی است و همچنین با حالات پاتوفیزیولوژیکی در بیماری‌ها، مانند مالاریا و سرطان ارتباط دارد [۷۹]. پیشرفت‌های اخیر در زمینه میکروفلوئیدیک بر اساس خواص الکتریکی سلول‌ها موجب ساخت دستگاه‌هایی مبتنی بر میدان الکتریکی و امپدانس فلوسایتومتری شده‌است. دستگاه‌های مبتنی بر امپدانس فلوسایتومتری اخیراً برای اندازه‌گیری مقاومت سلول‌ها ارائه شده‌است تا یک سلول منفرد را با استفاده از الکتروود اندازه‌گیری کند [۸۰].

در بررسی یک سامانه میکروفلوئیدیک که ساختار پایه آن شیشه و از یک لایه پلی دی متیل سیلوکسان همراه با یک کانال منقبض معرفی شده است. کانال این دستگاه فقط از یک ورودی و یک خروجی تشکیل شده‌است هنگامی که سلول‌ها درون کانال منقبض شده قرار می‌گیرند و از آن عبور می‌کند در نتیجه یک افزایش تدریجی در دامنه خروجی دستگاه اشکارساز به عنوان تابعی از زمان ایجاد می‌شود این پدیده در سلول‌های بزرگتر که فشردن آن‌ها درون کانال منقبض سخت تر است و زمان

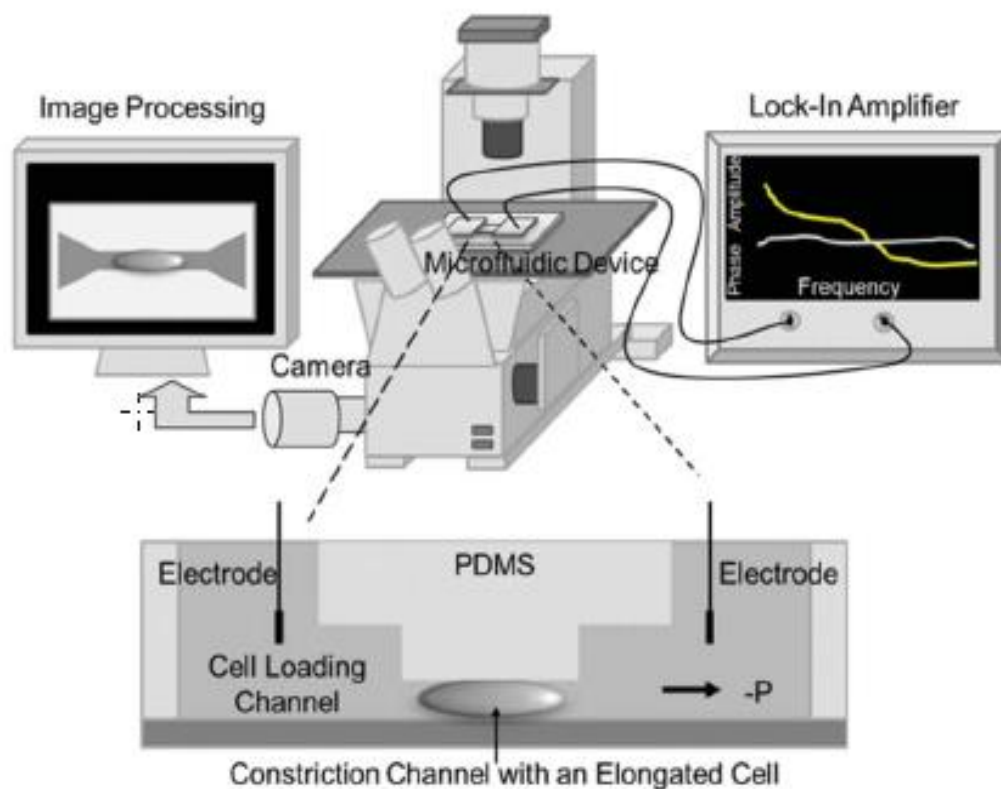
عبور کاهش می‌یابد بسیار دقیق‌تر است نسبت به سلول‌های کوچک‌تر که زمان ورود و خروج آن‌ها بسیار کوتاه است [۸۱].



شکل ۳-۸: سامانه میکروفلوئیدیکی امپدانس فلوسایتومتری با کانال منقبض شده [۸۱]

همانطور که در شکل ۳-۸ پیدا است عملکرد دستگاه به این صورت است که با عبور سلول از کانال و با بازتاب نور از سلول‌ها به سمت آشکارسازها یک جهش در خروجی خواهیم داشت که این امر موجب شناسایی سلول می‌شود.

بررسی دیگری توسط یانگ ژو و همکاران ارائه شده است در این پژوهش از میکروفلوئیدیک با کانال منقبض شونده استفاده شده است که ساختار آن هم شیشه به عنوان پایه و پلی دی متیل سیلوکسان است و الکترودهای آن به صورت ایستاده در کناره دیواره قرار دارد. این دستگاه فقط برای شناسایی و طبقه بندی سلول‌های سرطانی سینه و تعیین مقدار کمیت الکتریکی مورد استفاده قرار گرفته است سلول‌های مورد بحث از کانال منقبض شونده عبور داده می‌شوند و با استفاده از روش مکانیکی سلول‌ها در دو طرف الکترودهای قرار می‌گیرند در حالی که کمیت‌های الکتریکی آن‌ها در فرکانس ۱ کیلوهرتز و ۱۰۰ کیلوهرتز اندازه‌گیری می‌شود [۸۲].



شکل ۳-۹: نمای کلی از آزمایش با استفاده از سامانه میکروفلوئیدیکی امپدانس فلوسایتومتری با کانال منقبض شده [۸۲]

شی و همکاران، دستگاه میکروفلوئیدیکی مبتنی بر طیف سنجی امپدانس الکتریکی برای شناسایی لیپوزومها و وزیکولها و اگزومها ارائه کردهاند. ساختار پایه آن از شیشه و جنس میکروکانالها PDMS می باشد عملکرد دستگاه براساس طیف سنجی نسبت ولتاژ اعمالی به ذرات و جریان بدست آمده از آنها می باشد [۸۳].

### ۳-۵ راهکار مورد استفاده در این پژوهش

برای شناسایی و جداسازی سلولهای سرطانی روشهای مختلفی وجود دارد و به طور کلی می توان به دو روش عمده فعال و غیرفعال تقسیم بندی کرده که این روشها هیچ گونه برتری نسبت به یکدیگر ندارند و هر کدام بسته به هدفی که وجود دارد کاربرد دارند.

هدف در این پژوهش شناسایی و جداسازی سلول‌های سرطانی می‌باشد. در قسمت شبیه‌سازی با استفاده از ترکیب نیروی دی‌الکتروفورسیس و نیروی گریز از مرکز جداسازی کامل و با سرعت بالای سلول‌های سرطانی انجام می‌گیرد دلیل استفاده از روش این است که سلول‌های سرطانی با گلبول سفید خون از نظر ابعاد هم پوشانی دارند و با استفاده از فقط یک روش به بازدهی کمی از جداسازی خواهیم رسید. و در قسمت شناسایی برای شناسایی سلول‌های هدف از روش امپدانس فلوسایتومتری استفاده می‌شود و دلیل انتخاب این روش سرعت بسیار زیاد شناسایی و طراحی ساده کانال و عدم انسداد کانال دستگاه میکروفلوئیدیک می‌باشد. در این پژوهش، در قسمت شناسایی با استفاده از الکترودهایی که در کف میکروکانال قرار می‌گیرد میدان الکتریکی مورد نظر را ایجاد می‌کنیم و با عبور دادن سلول‌های سرطانی منحنی امپدانس را مورد بررسی قرار می‌دهیم.

# فصل چهارم:

طراحی، تهیه سازی و ساخت

سامانه های میکروفلوئیدیک

## ۴-۱ مقدمه

این فصل شامل دو بخش شبیه سازی و ساخت سامانه میکروفلوئیدیک می باشد، که در قسمت شبیه سازی با استفاده از نیروی دی الکتروفورسیس و میدان الکتریکی سعی بر جداسازی سلول های سرطانی از گلبول های سفید خون شده است و در قسمت ساخت دستگاه به شناسایی سلول های سرطانی به روش فلوسایتومتری پرداخته شده است.

## ۴-۲ طراحی

اختلاف اندازه شعاع و ضریب گذردهی سلول سرطانی نسبت به دیگر اجزا خون می تواند جداسازی را به طور قابل توجهی تحت تاثیر قرار دهد و از این رو لزوم مطالعه ی دقیق جداسازی بر روی سلول های سرطانی سینه با در نظر گرفتن عرض کانال، سرعت سیال و میزان ولتاژ اعمال شده به الکترودها به چشم می خورد. در این مطالعه جداسازی سلول های سرطانی سینه از نمونه کامل خون با هدف بهره گیری در فرآیندهای تشخیصی و کاربردهای پزشکی انجام می گیرد.

برای این منظور ابتدا ابعاد کانال و میزان ولتاژ اعمالی بر روی الکترودها مورد محاسبه قرار می گیرد و سپس سلول های سرطانی مورد آزمایش قرار می گیرند. سلول های سرطانی سینه و گلبول های سفید خون به ترتیب وارد میکروکانال می شوند و در ابتدا درون میکسر قرار می گیرند (هدف از این میکسر ترکیب کردن سلول ها و ایجاد جریان سیال غیر یکنواخت تا ذرات تحت تاثیر نیروی گریز از مرکز قرار بگیرند) و در ادامه وارد کانال اصلی می شوند که الکترودها باعث ایجاد میدان الکتریکی غیر یکنواخت شده اند و در آخر با تحت تاثیر قرار گرفتن نیروی دی الکتروفورسیس جداسازی انجام می شود.

## ۴-۱-۲ تئوری سیال

عدد رینولدز به صورت نسبت نیروی اینرسی به ویسکوزیته تعریف می شود و می تواند جهت تشخیص نوع حرکت سیال در داخل دستگاه میکروفلوئیدیک مورد استفاده قرار گیرد. عدد رینولدز با رابطه ۴-۱ تعریف می شود [۸۴].

$$R_e = \frac{\rho W U}{\mu} \quad (4-1)$$

به صورتی که  $\rho$  چگالی سیال و  $W$  عرض کانال و  $U$  سرعت حرکت سیال و  $\mu$  ویسکوزیته ماده می باشد. یکی از کاربردهای مهم عدد رینولدز تعیین آرام یا آشفته بودن جریان است که اگر عدد رینولدز از مقدار یک کم تر باشد جریان آرام و اگر بیش تر باشد آشفته است. این مقدار خاص عدد رینولدز بحرانی نام دارد و با  $R_e$  نشان داده می شود. عدد رینولدز برای این پژوهش  $0/6$  است که این عدد نشان دهنده جریان آرام درون کانال میکروفلوئیدیک می باشد [۸۵].

#### ۴-۲-۲-۲ خواص فیزیکی ذرات

پدیده دی الکتروفورسیس حرکتی را توصیف می کند که به واسطه قطبی شدن یک ذره خنثی درون میدان الکتریکی غیریکنواخت ایجاد شده است برای محاسبه میزان این نیرو نیاز به خواص فیزیکی سلول ها می باشد. خواص فیزیکی و دی الکتریکی و پارامترهای مربوط به سلول ها در جدول ۴-۱ [۸۶] و [۸۷] آورده شده است.  $t$  و  $d$  به ترتیب ضخامت لایه اول و دوم سلول،  $\sigma_n$  و  $\sigma_s$  به ترتیب ضریب هدایت لایه اول و دوم سلول،  $\epsilon_n$  و  $\epsilon_s$  به ترتیب ضریب گذردهی لایه اول و دوم سلول می باشد.

جدول ۴-۱ خواص دی الکتریک سلول ها

پارامتر	واحد	گلبول های سفید	سلول سرطان سینه
$d$	um	۱۲	۱۷
$t$	um	۷	۱
$\sigma_n$	S/m	۰/۶۵	۰/۸
$\epsilon_n$	—	۶۰	۶۰
$\sigma_s$	S/m	۰/۰۰۰۲۷	۰/۰۰۰۱۵
$\epsilon_s$	—	۶	۶

### ۴-۲-۳ اثر نوع میدان الکتریکی اعمالی

در این قسمت رابطه ولتاژ و میدان الکتریکی را بررسی خواهیم کرد. یک میدان الکتریکی یکنواخت  $E$  با قرار دادن اختلاف پتانسیل (ولتاژ  $\Delta V$ ) در دو صفحه فلزی موازی (با نام  $A$  و  $B$ ) ایجاد می شود بررسی این موضوع به ما می گوید که چه ولتاژی برای تولید یک قدرت میدان الکتریکی خاص لازم است همچنین رابطه اساسی تری بین پتانسیل الکتریکی و میدان الکتریکی نشان خواهد داد.

از نظر فیزیکدانان، می توان از  $\Delta V$  یا  $E$  برای توصیف توزیع بار استفاده کرد  $\Delta V$  بیشترین ارتباط را با انرژی دارد در حالی که  $E$  بیشترین ارتباط را با نیرو دارد  $\Delta V$  یک مقدار اسکالر است و هیچ جهتی ندارد در حالی که  $E$  یک مقدار بردار است رابطه بین  $\Delta V$  و  $E$  با محاسبه کار انجام شده توسط نیرو در انتقال بار از نقطه  $A$  به نقطه  $B$  مشخص می شود کار انجام شده توسط میدان الکتریکی برای انتقال بار مثبت  $q$  از  $A$  (صفحه مثبت، پتانسیل بزرگتر) به  $B$  (صفحه منفی، پتانسیل کوچکتر) به صورت معادله ۴-۲ و ۴-۳ محاسبه می گردد

$$W = -q\Delta V \quad (۲-۴)$$

$$\Delta V = V_A - V_B \quad (۳-۴)$$

مقدار کار انجام شده برابر است با  $W = fd \cos \theta$  که در اینجا  $\cos \theta = 1$  می باشد از آنجا که مسیر موازی با میدان است. بنابراین  $W = fd$  و از آنجا که  $f = qE$  است می بینیم که  $W = qEd$  جایگزینی این عبارت برای کار انجام شده در معادله ۴-۲ به صورت معادله ۴-۴ محاسبه می گردد.

$$qEd = qV_{AB} \quad (۴-۴)$$

و در نتیجه مقدار میدان الکتریکی به صورت معادله ۴-۵ محاسبه می گردد.

$$E = \frac{V_{AB}}{d} \quad (۵-۴)$$

که در این معادله  $d$  فاصله بین دو الکتروود می باشد و با توجه به معادله ۴-۵ واحد میدان الکتریکی ولت بر متر می باشد.

اگر میدان الکتریکی یکنواخت باشد نیروی وارد بر هر دو قطب برابر و مخالف است. بنابراین نیروی خالص صفر است و هیچ حرکتی وجود ندارد. از طرف دیگر اگر میدان الکتریکی غیر یکنواخت باشد نیروی وارد بر هر دو قطب برابر نیست. بنابراین نیروی خالص برابر با صفر نیست و حرکت ذره وجود دارد.

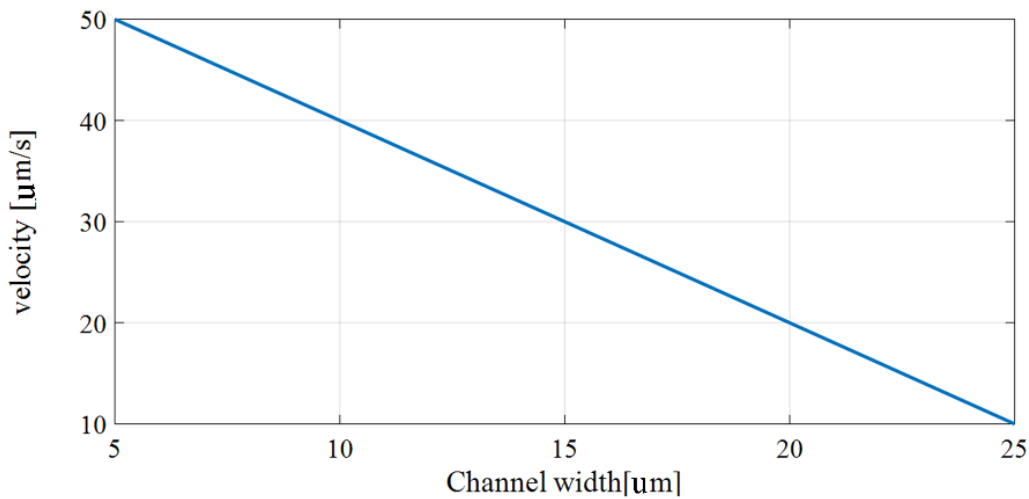
در میدان الکتریکی غیر یکنواخت نیرویی که به هر طرف ذره وارد می شود متفاوت خواهد بود و باعث حرکت ذره می شود بسته به قطبش پذیری ذره در مقایسه با ماده نیرو می تواند ذره را به سمت مناطق میدان الکتریکی بزرگتر یا مناطق میدان الکتریکی کوچکتر حرکت دهد. بعلاوه اگر ذرات دارای رسانایی بالاتری نسبت به ماده غوطه وری داشته باشند آن‌ها به سمت مناطق دارای میدان الکتریکی بزرگ حرکت می کنند. برعکس اگر ذرات رسانایی کمتری نسبت به محیط داشته باشند از مناطق دارای میدان الکتریکی بزرگ به سمت مناطق دارای میدان الکتریکی کمتر دور می شوند [۸۹].

#### ۴-۲-۴ انتخاب ولتاژ و سرعت سیال

سرعت سیال یکی از تاثیر گذارترین فاکتورها در بازدهی می باشد اگر سرعت سیال بیش از حد کم باشد باعث می شود ذرات بیشتر تحت تاثیر میدان الکتریکی قرار گیرند و به سمت الکترودها منحرف شوند که این امر باعث می شود به الکترودها بچسبند و اگر بیش از حد سرعت سیال زیاد باشد باعث انسداد میکروکانال می شود برای بدست آوردن سرعت سیال مناسب از معادله ۴-۶ استفاده می شود.

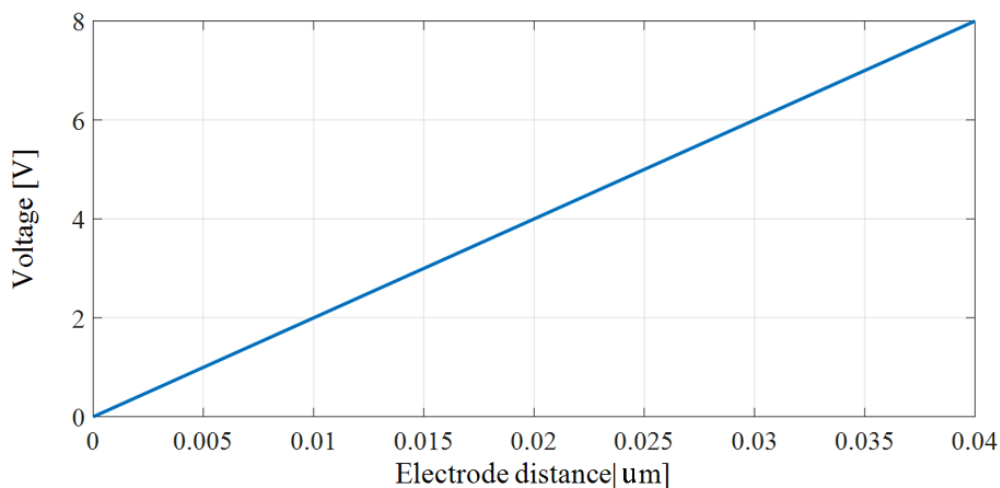
$$Q = vA \quad (۴-۶)$$

که در این معادله  $A$  مساحت میکروکانال و  $v$  سرعت سیال است. یکی از چالش‌های اصلی انتخاب مقدار سرعت سیال و عرض کانال می باشد. میزان نیروی پسا رابطه مستقیمی با سرعت سیال دارد هرچقدر مقدار سرعت سیال زیاد انتخاب شود تنش بیشتری بروی ذرات اتفاق می افتد از طرفی دیگر میزان عرض کانال باید به گونه‌ای انتخاب شوند که میدان الکتریکی ایجاد شده تمام آن را پوشش دهد.



شکل ۴-۱: نمودار سرعت بر حسب عرض کانال

با بهره‌گیری از دیگر شبیه‌سازی‌ها میانگین نرخ دبی بدست آمده و با استفاده از معادله ۴-۶ نسبت سرعت سیال به عرض کانال به صورت نمودار ۴-۱ بدست می‌آید همانطور که از نمودار شکل ۴-۱ پیداست با افزایش عرض کانال سرعت سیال کاهش می‌یابد. یکی دیگر از فاکتورهای مورد بررسی و تاثیر گذار در بازدهی میدان الکتریکی می‌باشد که متناسب با ولتاژ اعمالی و فاصله الکترودها از هم می‌باشد به همین منظور با استفاده از معادله ۴-۵ فاصله الکترودها و ولتاژ مناسب برای ایجاد میدان الکتریکی محاسبه می‌گردد.

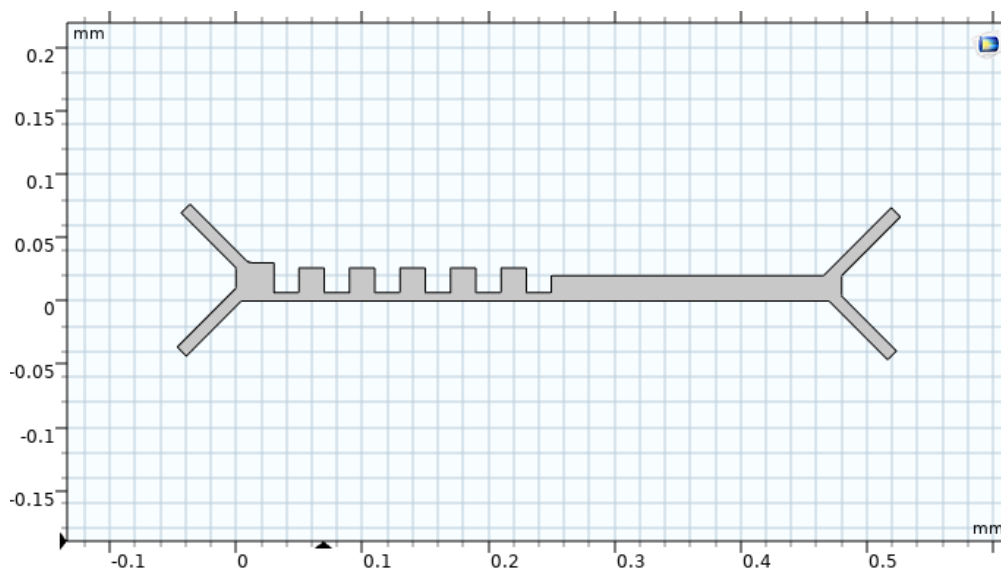


شکل ۴-۲: نمودار ولتاژ بر حسب فاصله الکترودها

بعد از انجام محاسبات برای کاهش عرض کانال نسبت به دیگر ساختارها عرض کانال انتخاب شده در این پژوهش برابر ۲۰ میکرومتر است و با استفاده از نمودار ۴-۱ سرعت سیال مناسب ۱۲ میکرومتر بر ثانیه بدست می‌آید برای ایجاد میدان الکتریکی غیریکنواخت ولتاژ اعمالی برابر با ۵ ولت است و با استفاده از نمودار ۴-۲ فاصله الکترودها از هم برابر ۰/۰۳ میکرومتر انتخاب می‌شود.

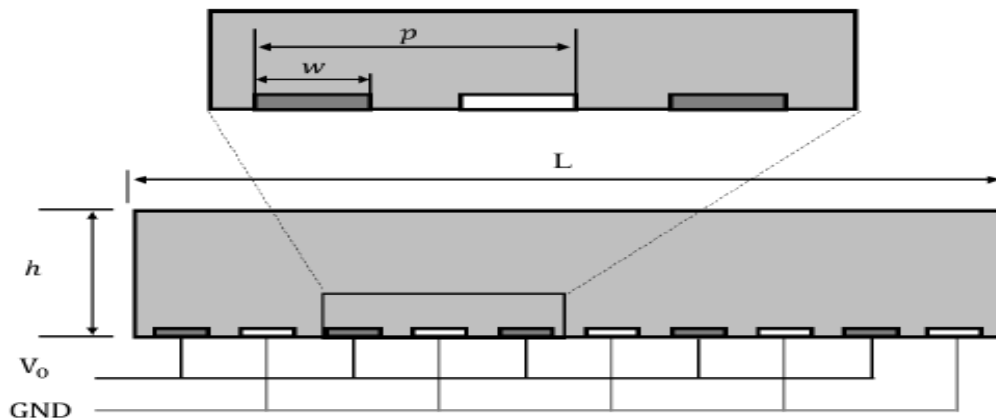
#### ۴-۲-۵ هندسه

اولین گام برای یک شبیه سازی مطلوب ایجاد هندسه مناسب می‌باشد در این بخش امکان وارد کردن هندسه از نرم افزار دیگر هم وجود دارد ولی با توجه به ساختار ساده‌ای که در این شبیه سازی داریم از همان نرم افزار کامسول برای طراحی هندسه استفاده می‌کنیم.

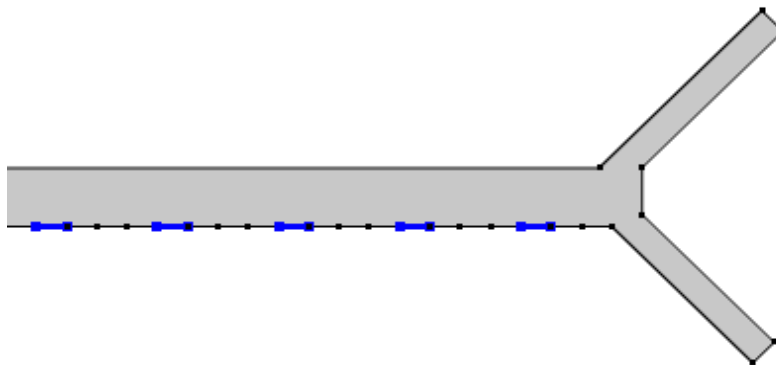


شکل ۴-۳: هندسه سامانه میکروفلوئیدیک ترکیبی با استفاده نیروی گریز از مرکز و میدان الکتریکی

همان‌طور که در شکل ۴-۳ پیدا است از یک کانال اصلی به طول ۰/۲۵ میلی‌متر و ورودی‌هایی به طول ۰/۰۸ میلی‌متر استفاده کرده‌ایم ساختار الکتروود ما بصورت شانه‌ای می‌باشد که با استفاده از دستور تکثیر الکترودها آن‌ها را به صورت منظم در دیواره کانال اصلی قرار می‌دهیم.



شکل ۴-۴: جانمایی الکترودها



شکل ۴-۵: جانمایی الکترودهای کانال اصلی سامانه میکروفلوئیدیک ترکیبی با استفاده نیروی گریز از مرکز و میدان الکتریکی

#### ۴-۲-۶ انتخاب ماده و مشخصات ذرات

در این قسمت باید مشخصات سیال مورد بررسی انتخاب شود تا مسئله با ویژگی خاص این ماده حل شود. در نرم افزار کامسول مشخصات انواع ماده مانند چگالی و چسبندگی و دیگر ویژگی‌ها از پیش مشخص شده است چنانچه مشخصات ماده مورد نیاز درون نرم افزار موجود نباشد می‌توان با وارد کردن خواص مایع مورد نظر ماده‌ی جدید را تعریف کرد.

در شبیه سازی این پروژه ماده مورد نظر پلی دی متیل سیلوکسان است (دلیل استفاده از این ماده در دسترس بودن، منعطف بودن و غیرسمی بودن است) که دارای چهار پارامتر اساسی که به ترتیب عبارت است از چگالی ماده، ویسکوزیته ماده، میزان هدایت الکتریکی و ضریب گذردهی مورد نیاز است.

و سیال مورد نیاز در این پژوهش خون می‌باشد که چگالی سیال را مانند چگالی آب ۱۰۰۰ کیلوگرم بر متر مکعب و ویسکوزیته هم ۰/۰۰۰۱ کیلوگرم بر متر در ثانیه و نفوذ پذیری را ۷۸ و هدایت الکتریکی را ۲۱۰ زیمنس بر ثانیه انتخاب می‌کنیم.

جدول ۲-۴ مشخصات سیال مورد بررسی

پارامتر	واحد	مقدار
چگالی	$\text{kg/m}^3$	۱۰۰۰
ویسکوزیته	$\text{Pa} \times \text{s}$	۱۰۰
ضریب هدایت	—	۷۸
ضریب نفوذ پذیری	$\text{S/m}$	۲۱۰
دما	$\text{K}$	۲۷۳

#### ۷-۲-۴ انتخاب فیزیک

برای کار با نرم افزار کامسول باید نوع فضای مورد نیاز برای حل مسئله بین فضای دو بعدی و سه بعدی انتخاب کرد که عموماً در رشته‌ی برق برای کاهش زمان حل معادلات و تسریع در انجام کار فضای دو بعدی انتخاب می‌شود. پس از انتخاب نوع فضا باید ماژول یا فیزیک مورد نظر انتخاب شود. در این نرم افزار ۱۲ ماژول وجود دارد که هر کدام بسته به نوع خواست کاربر مورد استفاده قرار می‌گیرد. این پژوهش از دو بخش مهم که عبارت است از میدان الکتریکی و حرکت سیال تشکیل شده‌است برای قسمت میدان الکتریکی فیزیک جریان الکتریکی<sup>۱</sup> و برای قسمت حرکت سیال فیزیک جریان سیال<sup>۲</sup> را انتخاب می‌کنیم و نوع مطالعه وابسته به زمان<sup>۳</sup> می‌باشد.

#### ۸-۲-۴ انتخاب شرایط مرزی

برای فیزیک‌هایی انتخاب کردیم باید شرایطی برای آن‌ها تعیین کنیم. ابتدا از فیزیک جریان الکتریکی شروع می‌کنیم چیزی که از این فیزیک نیاز داریم که فراهم کند ایجاد میدان الکتریکی می‌باشد که

<sup>1</sup> Electric Currents

<sup>2</sup> Creeping Flow

<sup>3</sup> Time Dependent

برای انجام این عمل فقط دامنه‌های ولتاژ را برای الکترودها تعیین می‌کنیم که برای شبیه سازی این پژوهش مقدار ولتاژ ۵ ولت می‌باشد. در ادامه ترمینال‌های مثبت و منفی را تعریف کرده و ولتاژهای مورد نظر آنها را اعمال می‌کنیم و برای فیزیک جریان سیال باید قسمت‌های ورودی و خروجی سیال و سرعت حرکت سیال مشخص شود و در قسمت آخر باید مشخصات ذرات که در فصل دوم به صورت کامل توضیح داده شده‌است را وارد می‌کنیم که در این شبیه سازی از نظریه مدل تک سلولی استفاده می‌شود.

## ۳-۴ شبیه سازی

### ۴-۳-۱ نرم افزار

نرم افزار کامسول<sup>۱</sup> در سال ۱۹۸۶ توسط دانشجویان موسسه سلطنتی فناوری سوئد با نام فم لب<sup>۲</sup> ایجاد شده‌است و در سال ۲۰۰۵ با تغییرات وسیع به نرم افزار کامسول تغییر نام داده‌است. زمینه‌ی کاری این نرم افزار در حل انواع معادلات دیفرانسیل کوپل شده، طراحی و شبیه سازی سامانه‌های فیزیکی، نانوفیزیک، مهندسی برق و مکانیک و شیمی و سامانه‌های کوانتومی است.

کامسول امکان تحلیل و شبیه‌سازی و بهینه سازی انواع ساختارها در قالب یک معادله‌ی دیفرانسیل دلخواه ریاضی یا فیزیکی به شکل وابسته به زمان به کاربر می‌دهد در کنار فیزیک‌های ارائه شده در نرم افزار کامسول ماژول‌های دیگری با امکانات بیشتری در اختیار کاربر قرار می‌دهد دلیل انتخاب نرم افزار کامسول برای شبیه سازی محیط کاربری ساده و قابل درک کتابخانه بسیار غنی تعامل با نرم افزارهای دیگر مانند متلب و اکسل می‌باشد.

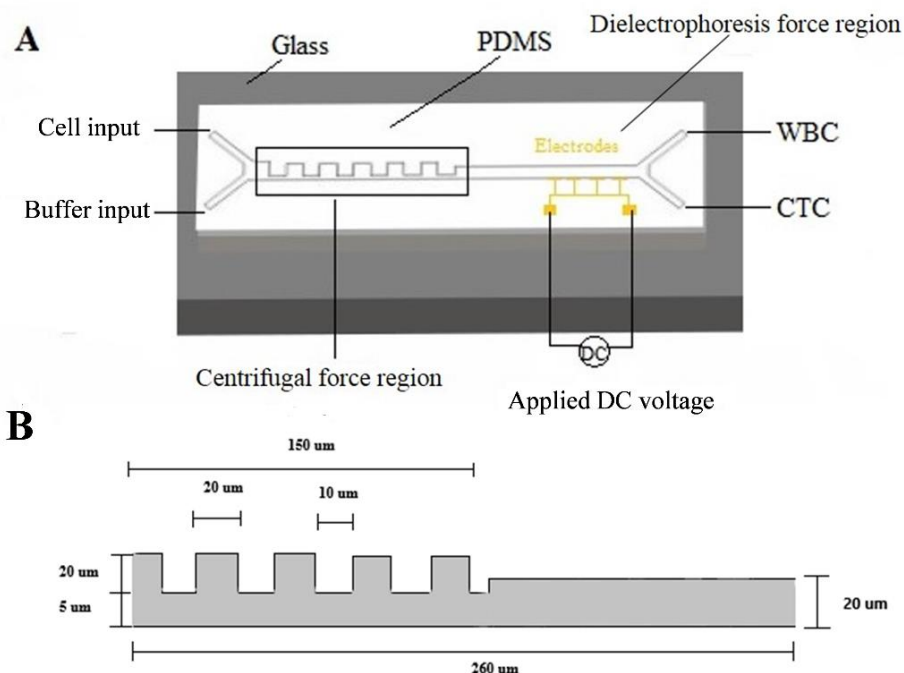
---

<sup>1</sup> Comsol

<sup>2</sup> Femlab

### ۲-۳-۴ ساختار میکروفلوئیدیک طراحی شده نهایی

برای شبیه سازی این پژوهش از نرم افزار کامسول استفاده شده است و برای محاسبه نیروهای وارده به ذرات و حرکت سیال از روش لاگرانژی استفاده می شود شبیه سازی به منظور جداسازی سلول سرطانی از سلول های گلبول سفید خون انجام میگیرد. در این آزمایش با استفاده از ولتاژ جریان مستقیم و اعمال آن به الکترودها میدان الکتریکی ایجاد می شود و سپس ذرات تحت تاثیر نیروی دی الکتروفوروسیس قرار می گیرند. ابعاد انتخاب شده براساس طراحی انجام شده ۳۰۰ میکرومتر در ۲۰ میکرومتر می باشد گلبول سفید خون با شعاع ۱۲ میکرومتر و سلول های سرطانی با شعاع ۱۷ میکرومتر از ورودی ۱ و بافر از ورودی ۲ وارد کانال اصلی می شوند، و برای ایجاد جریان سیال غیر یکنواخت و نیروی گریز از مرکز تعدادی مانع به شکل مربعی استفاده می شود.

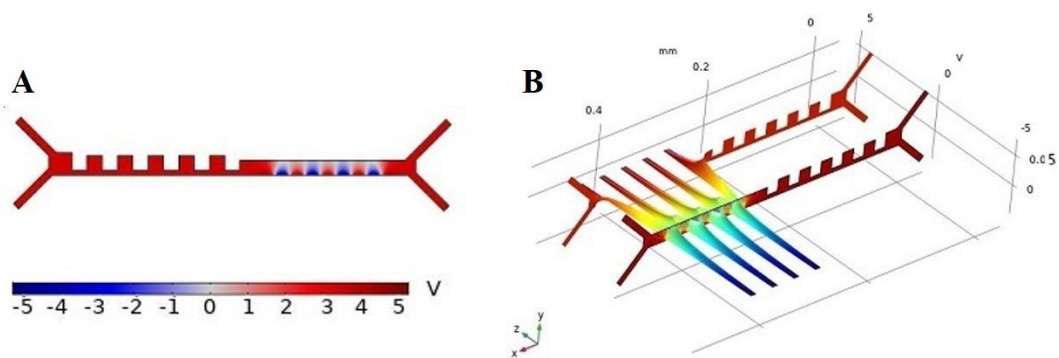


شکل ۴-۶: نمای کلی از میکروفلوئیدیک

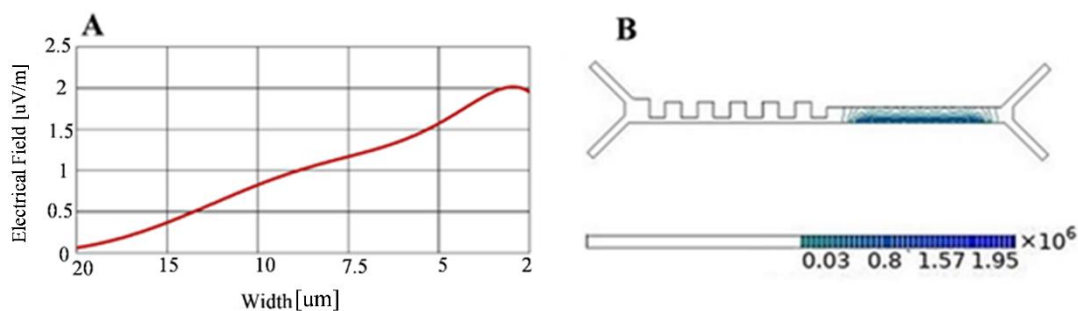
ذرات با سرعت ۱۲ میکرومتر بر ثانیه وارد قسمت میکسر می‌شوند و تحت تاثیر نیروی پسا به اندازه ۰/۰۲۷ نیوتون قرار می‌گیرند در ادامه ذرات وارد کانال اصلی می‌شوند و با تاثیر پذیری از نیروی دی الکتروفورسیس به اندازه ۰/۵ نیوتون بر اساس اندازه شعاع جداسازی انجام می‌شود

### ۳-۳-۴ توزیع پتانسیل الکتریکی در ساختار

همانطور که در بخش طراحی محاسبه گردید ولتاژ اعمال شده به الکترودها مثبت و منفی ۵ ولت در نظر گرفته شده‌است شبیه سازی نشان می‌دهد این میزان ولتاژ و فاصله الکترودها از هم میدان الکتریکی مناسبی برای عرض کانال ۲۰ میکرومتر به وجود می‌آورد.



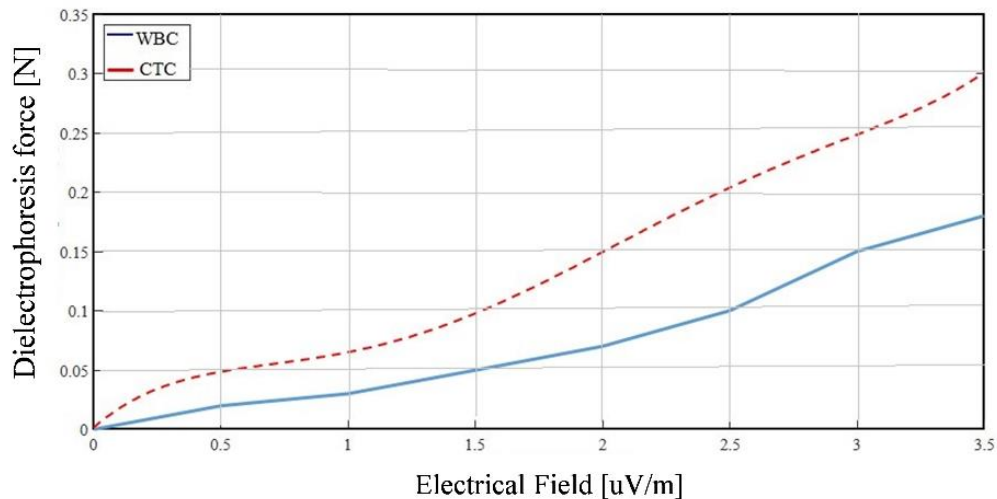
(الف)



(ب)

شکل ۴-۷: الف) کانتور پتانسیل الکتریکی ب) کانتور شدت میدان الکتریکی

همانطور که در شکل ۴-۷ پیدا است میدان الکتریکی ایجاد شده کامل عرض کانال را پوشش می‌دهد و شدت میدان الکتریکی در اطراف الکترودها بیشینه است. نیروی دی الکتروفورسیس متاثر از شدت میدان الکتریکی و شعاع ذرات می‌باشد انتظار می‌رود سلول‌های سرطانی با توجه به اینکه شعاع هسته بزرگتری نسبت به گلبول‌های سفید خون دارند بیشتر تحت تاثیر نیروی دی الکتروفورسیس قرار بگیرند نمودار شکل ۴-۸ میزان نیروی دی الکتروفورسیس در شدت میدان‌های مختلف برای سلول‌های سرطانی و گلبول سفید خون را مشخص کرده است.

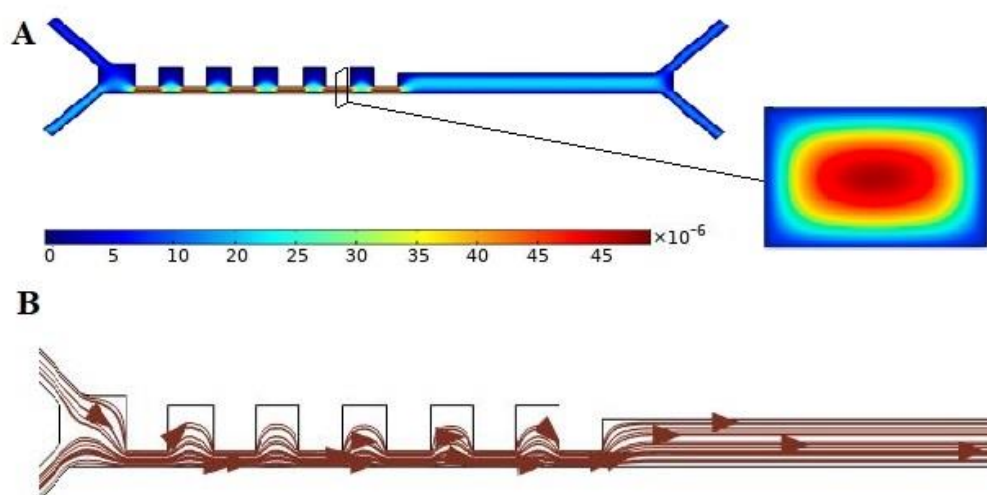


شکل ۴-۸: نیروی دی الکتروفورسیس برای گلبول‌های سفید خون و سلول‌های سرطانی

همان‌طور که از شکل ۴-۸ پیدا است در ابتدا نیروی دی الکتروفورسیس که بر روی سلول سرطانی و گلبول سفید اعمال می‌شود تقریباً یکسان است. با حرکت کردن ذرات درون کانال و مواجه شدن با میدان الکتریکی بزرگتر نیروی دی الکتروفورسیس بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی اعمال می‌شود. دلیل این کار نیز اندازه شعاع بزرگتر سلول‌های سرطانی است و همین امر باعث جداسازی ذرات می‌شود.

### ۴-۳-۴ سرعت سیال

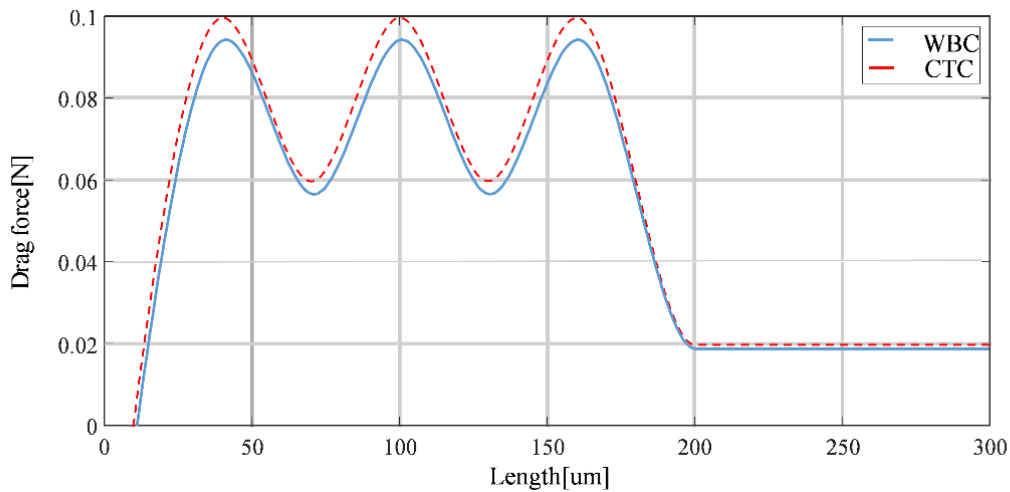
در قسمت سرعت سیال با استفاده از مانع‌های مربعی شکل برای متمرکز کردن سیال و افزایش سرعت جهت کاهش زمان جداسازی استفاده شده است. در ابتدای کانال میکروفلوئیدیک نحوه حرکت سیال کامل نشده است و سرعت سیال برابر با ۱۲ میکرومتر بر ثانیه است در ادامه سیال وارد قسمت میکسر می‌شود با افزایش و کاهش شدید سرعت رو به رو می‌شود و این مقدار نزدیک به ۴۰ میکرومتر بر ثانیه است شکل ۴-۱۰ بیانگر میزان سرعت سیال در قسمت‌های مختلف میکروفلوئیدیک است. شبیه سازی نشان می‌دهد حرکت سیال درون میکروکانال آرام بوده (گرفتگی ندارد) و نتایج تجربی بدست آمده از شبیه سازی توسط نرم افزار کامسول با نتایج عددی بدست آمده در شکل ۴-۲ اعتبار سنجی شده است و مشخص می‌کند که سرعت انتخاب شده برای این پژوهش مناسب است.



شکل ۴-۹: کانتور سرعت سیال در قسمت‌های مختلف

نیروی پسا رابطه مستقیمی با سرعت سیال دارد و افزایش این نیرو باعث ایجاد تنش در ذرات می‌شود نمودار شکل ۴-۱۰ میزان نیروی پسا در سرعت‌های مختلف را نمایش می‌دهد.

<sup>1</sup> Fluid Velocity Profiles



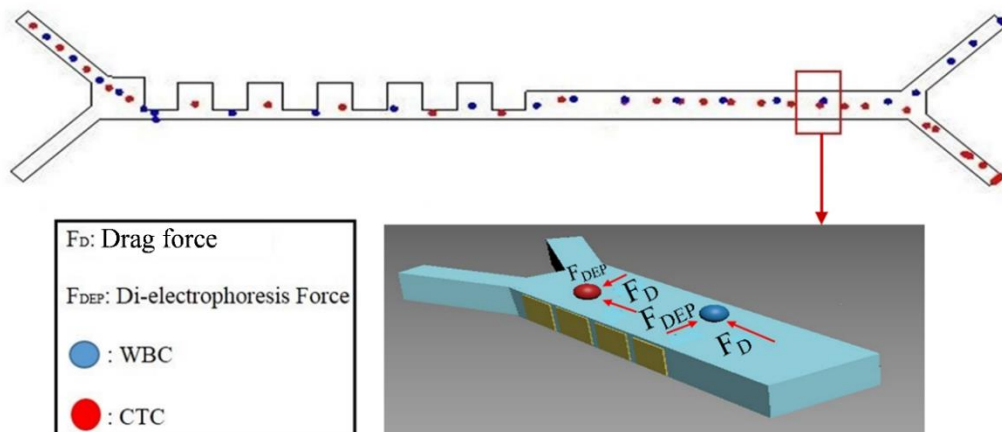
شکل ۴-۱۰: نمودار نیروی پسا تحت سرعت‌های مختلف

همان‌طور که در شکل ۴-۱۰ پیدا است درون میکسر بیشترین اختلاف سرعت سیال را داریم که همین اختلاف باعث اعمال نیروی پسا زیادی بر روی ذرات می‌شود.

#### ۴-۳-۵ مسیر حرکت ذرات

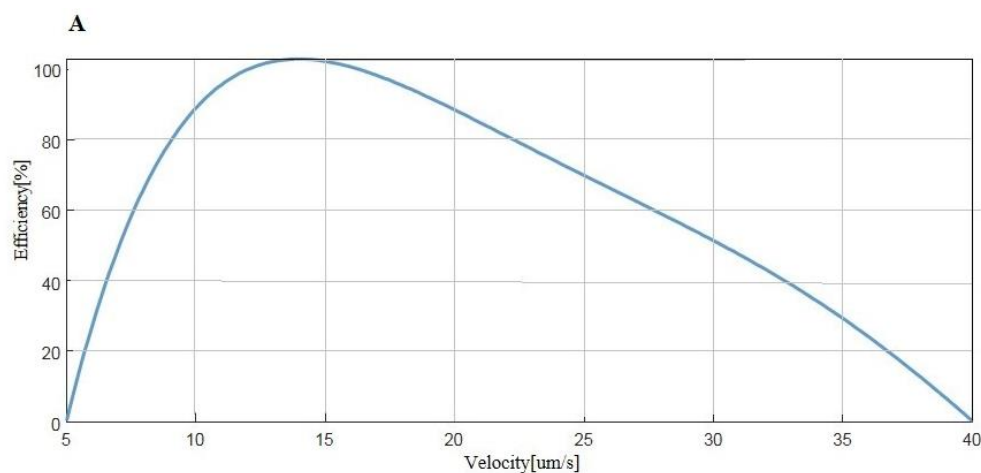
مسیر حرکت ذرات با استفاده از رویکرد دی الکتروفورسیس پیشنهاد شده با نتایج ارائه شده توسط ژانگ و همکاران (۲۰۲۰) اعتبار سنجی شده است [۹۰]. در این مطالعه از میکروفلوئیدیکی (با شکل Y) با حالت دندان اره‌ای در کانال اصلی استفاده شده است، الکترودها بر روی قسمت‌های دندان اره‌ای قرار گرفته‌اند و ولتاژ اعمال شده برابر یا  $1/6$  ولت تا  $2/2$  ولت در فرکانس  $100$  کیلوهرتز می‌باشد، مقدار عرض کانال  $50$  میکرومتر و سرعت سیال انتخاب شده برابر  $25$  میکرومتر بر ثانیه است میزان بازدهی جداسازی در این پژوهش نزدیک به  $99\%$  می‌باشد. شکل ۴-۱۲ مسیر حرکت ذرات در این پژوهش را نشان می‌دهد که عمل جداسازی به صورت کامل انجام می‌پذیرد، نتایج بدست آمده از شبیه‌سازی در نرم افزار کامسول با نتایج ارائه شده توسط ژانگ و همکاران منطبق است. بنابراین روش شبیه‌سازی ارائه شده در این مطالعه قابلیت پیاده‌سازی برای جداسازی سلول‌های سرطانی را دارا است. سلول‌های سرطانی MCF-7 و گلبول‌های سفید به دلیل اختلاف کمی که در اندازه شعاع آن‌ها وجود دارد جداسازی

آن‌ها کمی دشوار است در این شبیه‌سازی با ترکیب کردن نیروی گریز از مرکز و دی‌الکتروفورسیس تلاش بر افزایش بازدهی جداسازی شده‌است. در این پژوهش با استفاده از کانال‌های منقبض و منبسط شونده سعی برای ایجاد نیروی گریز از مرکز شده تا در ابتدا ذرات تحت تاثیر این نیرو قرار بگیرند و سپس با اعمال نیروی دی‌الکتروفورسیس جداسازی به بهترین شکل انجام شود.

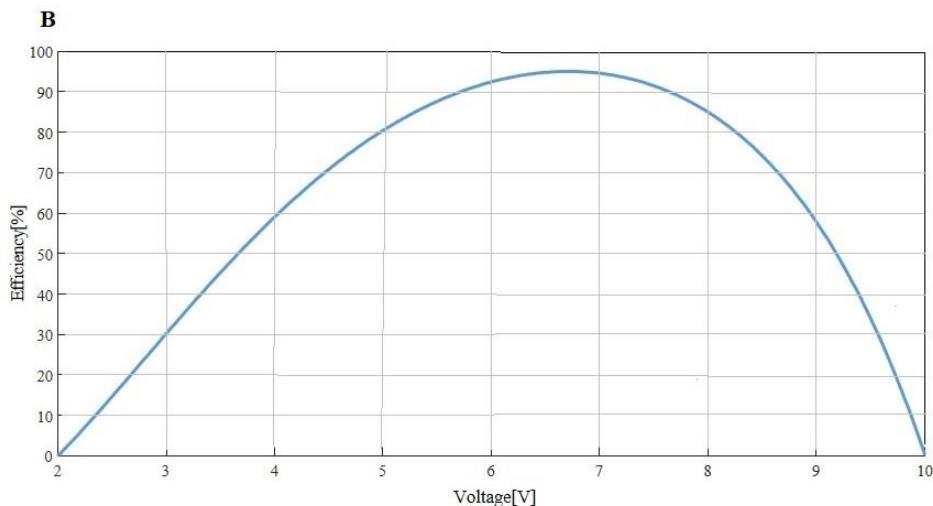


شکل ۴-۱۱: حرکت ذرات درون میکروکانال

بازدهی به نسبت تعداد جدا شده سلول سرطانی از گلبول سفید خون تعریف می‌شود. بهترین عملکرد در بازه‌ی ولتاژی ۵ ولت تا ۷ ولت با بازدهی ۱۰۰٪ برای سلول‌های سرطانی و ۹۹٪ برای گلبول‌های سفید خون می‌باشد و افزایش بیشتر ولتاژ باعث چسبیدن ذرات به الکترودها می‌شود.



(الف)



(ب)

شکل ۴-۱۲: الف) بازده برحسب ولتاژ (ب) بازده برحسب سرعت سیال

همان‌طور که در شکل ۴-۱۲ پیدا است بهترین بازه ولتاژ برای عملکرد این دستگاه ۵ تا ۷ ولت می‌باشد. با اعمال ولتاژ کمتر از ۵ ولت ذرات کمتر تحت تاثیر نیروی دی الکتروفرسیس قرار می‌گیرند و جداسازی انجام نمی‌شود با افزایش ولتاژ از ۷ ولت انحراف ذرات بیش از حد بوده و باعث چسبیدن ذرات به الکتروود می‌شود در قسمت سرعت سیال با کاهش سرعت از ۱۲ میکرومتر بر ثانیه ذرات به انتها کانال نمی‌رسند و جذب الکتروودها می‌شوند و با افزایش بیشتر از ۱۵ میکرومتر بر ثانیه باعث انسداد کانال می‌شود.

#### ۴-۴ ساخت سامانه میکروفلوئیدیک جهت تشخیص سلول سرطانی

روش‌های مختلفی برای ساخت قطعات میکروفلوئیدیک وجود دارد. لیتوگرافی نوری، استفاده از دستگاه‌های CNC، لیزرکاری و لیتوگرافی نرم از جمله این روش‌ها هستند. با توجه به کاربردهای زیستی قطعات میکروفلوئیدیک و ابعاد ریز آن‌ها امکان استفاده از دستگاه‌های CNC و لیزرهای موجود در کشور به دلیل دقت پایین آن‌ها کم است. بنابراین برای ساخت طرح‌های موردنظر از دو روش متداول برای ساخت این نوع قطعات یعنی لیتوگرافی نوری و نرم استفاده خواهد شد.

#### ۴-۴-۱ طراحی و پیاده سازی الکتروود

از الگوهای مختلفی برای طراحی الکتروود استفاده می‌شود که به تعدادی از آنها می‌توان اشاره کرد، این الکتروودها عبارتند از کنگره‌ای، شانه‌ای، دو طبقه، منحنی و چهارگانه. برای شناسایی و جداسازی ذرات با توجه به اینکه سلول‌های سرطانی از غلظت کمتری برخوردار هستند باید از الگویی استفاده کرد که ویژگی‌های زیر را دارا باشد.

- ایجاد گرادیان الکتریکی قوی
- فرایند ساخت و طراحی ساده داشته باشد
- برای ذرات با خلوص کم قابل استفاده باشد

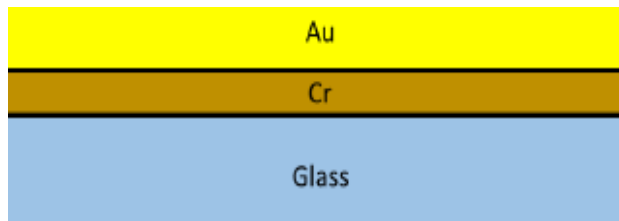
برای شناسایی سلول‌های سرطانی از یک جفت الکتروود در کف کانال استفاده می‌شود دلیل استفاده از این جفت الکتروود افزایش حساسیت شناسایی سلول‌ها می‌باشد. در این روش نیاز به ایجاد میدان الکتریکی بسیار قوی نمی‌باشد و اگر از تعداد زیادی الکتروود استفاده شود ممکن است یک سلول چندین بار مورد شناسایی قرار بگیرد که این امر حساسیت دستگاه را کاهش می‌دهد همچنین از الکتروود برای اعمال ولتاژ و محاسبه‌ی مقاومت ذرات برای شناسایی آنها استفاده می‌شود.

#### ۴-۴-۲ ساخت الکتروود

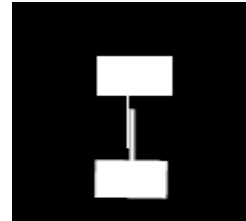
با توجه به اینکه در عملگر طراحی شده سلول‌های سرطانی ارتباط مستقیمی با الکتروودها دارند و سیال نیز رسانایی قابل توجهی دارد جنس الکتروودها باید به گونه‌ای انتخاب شود که دارای ویژگی‌های رسانندگی بالا و مقاومت در برابر خوردگی و چسبندگی خوب به زیر لایه باشد.

با توجه به موارد ذکر شده در بالا طلا بهترین نوع جنس انتخاب شده برای الکتروودها می‌باشد ولی طلا چسبندگی خوبی به زیر لایه شیشه ندارد و به راحتی کنده می‌شود و هزینه ساخت بسیار بالایی دارد برای کاهش هزینه و عدم استفاده از لایه واسط در این پژوهش از دو نمونه الکتروود از جنس نیکل و تیتانیوم استفاده می‌شود. دلیل استفاده از الکتروود نیکل و تیتانیوم این است که در پژوهش‌های غیر

زیستی دیگر بیشتر به عنوان الکتروود استفاده شده‌اند به همین منظور در این پژوهش از این دو فلز استفاده می‌شود و مورد مقایسه قرار می‌گیرد.



(ب)

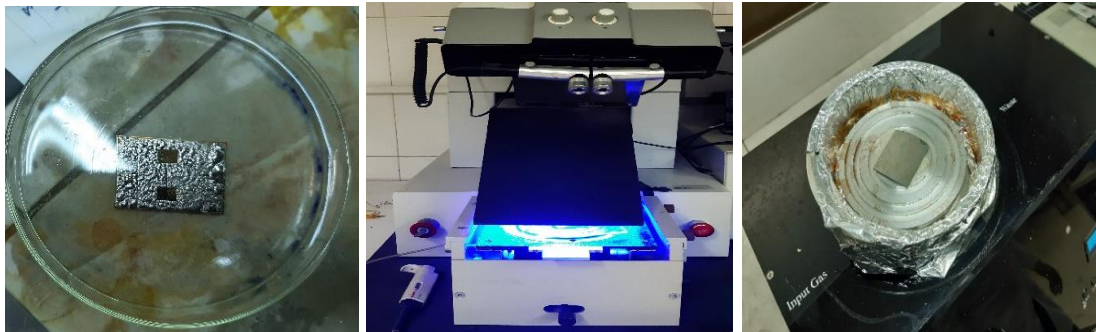


(الف)

شکل ۴-۱۳: الف) فیلم لیتوگرافی الکتروود (ب) استفاده از کروم به عنوان لایه واسط

برای ساخت الکتروود از روش فتولیتوگرافی استفاده می‌شود. مراحل ساخت الکتروود به صورت زیر است. در مرحله اول به وسیله دستگاه کندوپاش لایه نشانی نیکل و تیتانیوم بر روی شیشه انجام می‌شود ( فشار محفظه خلا  $2 \times 10^{-5}$  Torr و ولتاژ منبع تغذیه ۴۲۵ ولت و جریان ۲۵/۰ آمپر )، در مرحله بعد ماسک طراحی شده، با جوهر مخصوصی که جاذب نور فرابنفش است، بر روی طلق چاپ می‌شود. در مرحله بعد یک لایه ماده حساس به نور فرابنفش به ضخامت چند میکرومتر روی سطح زیرلایه شیشه که یک لایه نیکل و تیتانیوم بر روی آن قرار دارد، لایه‌نشانی می‌شود. (برای ایجاد این لایه از روش لایه‌نشانی چرخشی استفاده می‌شود که در اثر چرخش یک دیسک چرخان با سرعت ۲۰۰۰ تا ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۳۰ تا ۱۵ ثانیه لایه نشانی را انجام می‌دهد)، سپس این لایه با قرار گرفتن در کوره‌ای با دمای حدود ۹۰ تا ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سفت می‌شود و به صورت جامد روی سطح شیشه قرار می‌گیرد، (ماده حساس به نور استفاده شده S1813 می‌باشد که در دسته‌بندی مواد حساس به نور مثبت قرار می‌گیرد). در مرحله بعد با قرار دادن ماسک و تاباندن نور فرابنفش به سطح ماده حساس به نور (طول موج ۳۶۵ میکرو ولت و مدت زمان ۱/۵ ثانیه)، قسمت‌هایی که در معرض تابش نبوده‌اند، سفت می‌شوند. قسمت‌های در معرض تابش با حلال KOH شسته می‌شوند (۱)

قرص در ۵۰ میلی لیتر آب) و در آخر با ماده آسیتون شستشو می‌شوند و طرح نهایی بر روی شیشه ایجاد می‌شود.

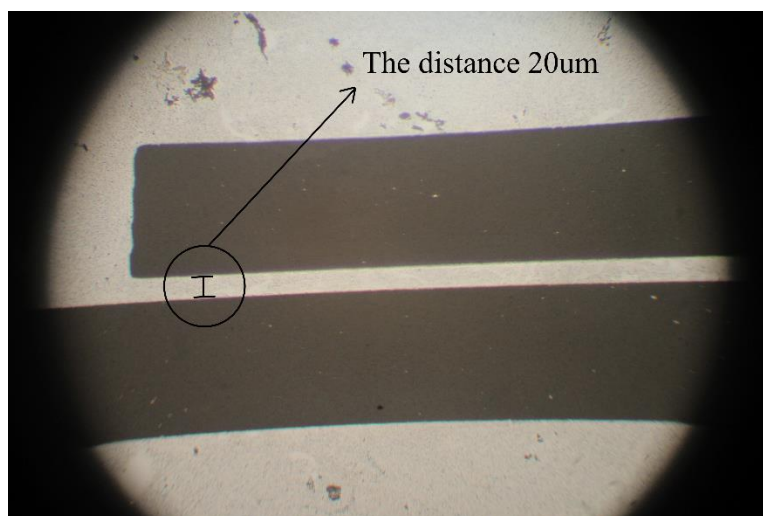


(ج)

(ب)

(الف)

شکل ۴-۱۴: مرحله (الف) لایه نشانی ماده حساس به نور به وسیله لایه نشانی چرخشی مرحله (ب) نوردهی فرابنفش مرحله (ج) زدایش ماده حساس به نور سفت شده، تیتانیوم و نیکل

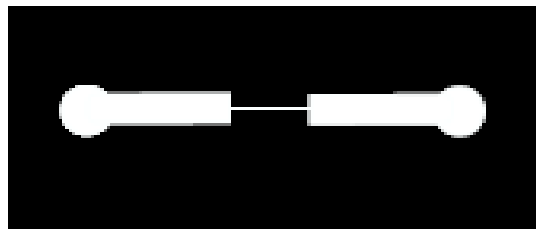


شکل ۴-۱۵: نمای میکروسکوپی از الکترودهای ایجاد شده بر روی زیر لایه شیشه

### ۳-۴-۴ ساخت میکروکانال

برای ساخت میکروکانال از پلیمری به نام پلی دی متیل سیلوکسان استفاده می‌شود این پلیمر بر پایه سیلیکون است و به دلیل اینکه خواص منحصر به فردی دارد بسیار مورد توجه می‌باشد. از جمله از این ویژگی‌ها می‌توان به تمیز شفاف بودن، خنثی و غیر سمی بودن، قابل انعطاف و غیرقابل اشتعال

اشاره کرد که کاربردهای وسیعی در سیستم‌های میکروفلوئیدیک پیدا کرده است، روند ساخت میکروکانال به شرح زیر می‌باشد.

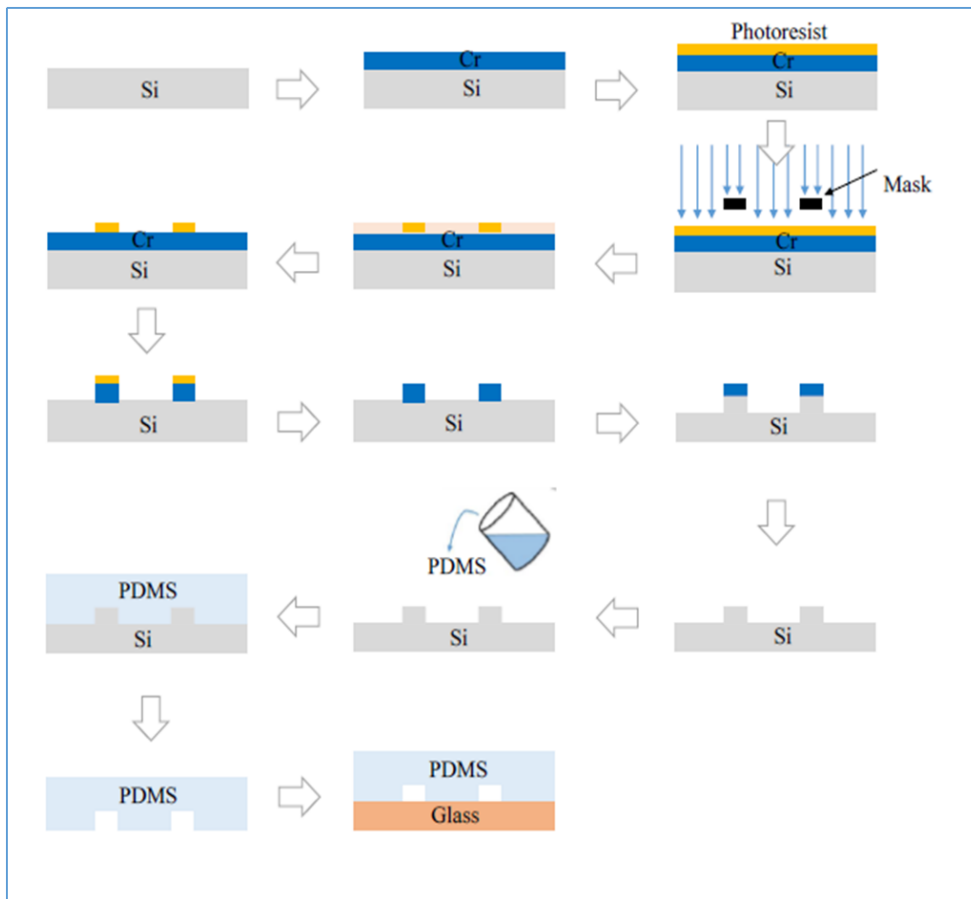


شکل ۴-۱۶: فیلم لیتوگرافی میکروکانال

- شست و شوی زیر لایه‌ی ویفر سیلیکونی
- ایجاد لایه کروم بر روی ویفر سیلیکونی با دستگاه کندوپاش (اسپاترینگ)
- پوشش دهی ماده حساس به نور با استفاده از پوشش دهی چرخشی رو زیر لایه پخت اولیه ماده حساس به نور به مدت ۲ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه
- قراردادن ماسک بر روی ماده حساس به نور و نوردهی ماده حساس به نور با استفاده از اشعه فرابنفش جهت سفت شدن منطقه نور خورده
- حذف ناحیه سفت نشده ماده حساس به نور به وسیله KOH و لایه کروم به وسیله HF
- زدایش سیلیکون به روش زدایش خشک با دستگاه زدایش عمیق یونی راکتیو<sup>۱</sup> (فشار محفظه خلا  $2 \times 10^{-1}$  Torr و توان ۲۰۰ وات با استفاده از گاز هگزاfluوئید و نیتروژن برای زدایش و گاز اکسیژن برای اکسید کردن به مقدار ۴۰۰ بار).
- ترکیب کردن ماده الاستومر و ماده عامل مربوط به آن به نسبت ۱۰ به ۱ و ریخته‌گری پلیمر بر روی قالب
- قرار دادن در خلا جهت از بین بردن حباب (دستگاه دسیکاتور)

<sup>۱</sup> Reactive Ion Etching

- پخت پلیمر در دمای ۶۰ درجه به مدت ۱ ساعت و بریدن و فرم دادن به پلیمر به وسیله کاتر و سوراخ کاری به منظور ایجاد ورودی و خروجی
- قرار دادن کانال ساخته شده بر روی الکترودها و اتصال آن‌ها با استفاده از دستگاه زدایش عمیق یونی راکتیو



شکل ۴-۱۷: مراحل ساخت دستگاه به روش لیتوگرافی

#### ۴-۴-۴ انتخاب سیال

بافر یک محلول مبتنی بر حلال آب است و از یک اسید ضعیف و باز مزدوج آن یا باز ضعیف و اسید مزدوجش تشکیل شده است. محلول های بافر در برابر تغییر PH ناشی از اضافه شدن کمی اسید یا باز و تغییر غلظت محلول مقاومت می کنند و اسیدیته محلول را در محدوده مشخصی ثابت نگه می دارند. حتی اسید و باز های قوی نیز تأثیر بسیار ناچیزی بر PH محلول های بافری می گذارند و همین قابلیت

مهم و ارزشمند باعث شده تا این محلول ها در زمینه های مختلفی چون تهیه نگهدارنده های غذایی، مواد شوینده، فرآورده های آرایشی و بهداشتی، چرم، رنگ و... کاربرد های زیادی داشته باشند. از جمله رایج ترین بافر های مورد استفاده در دنیای زیست شناسی می توان به بافرهای TAE و TBE و PBS اشاره نمود.

بافر TAE از مخلوط باز تریس<sup>۱</sup> و اسید استیک و ای دتا<sup>۲</sup> و بافر TBE از مخلوط باز تریس و بورات<sup>۳</sup> و ای دتا تشکیل شده اند در زیست شناسی ملکولی از اینها برای جداسازی به روش الکتروفورسیس و به طور معمول برای جداسازی اسید نوکلئیکها استفاده می شوند. TAE نسبت به TBE دارای ظرفیت پایین بافری و حساسیت گرمایی بالا و هزینه زیاد برای ساخت دارد. اما بهترین نوع بافر که از نظر ساخت کمترین هزینه و هدایت پذیری مناسبی برای این پژوهش محلول بافر PBS می باشد که از ترکیب آب و نمک و فسفات سالین تشکیل شده است. با ترکیب کردن و آب و  $0/8$  (g/L) نمک و اضافه کردن قرص فسفات سالین این بافر بدست می آید لازم به ذکر است که PH بدست آمده باید بین ۶ تا ۷ باشد.

#### ۴-۴-۵ مدل مداری کانال دارای سیال

جریان سنجی الکتریکی<sup>۴</sup>، تکنیکی است که در آن خصوصیات تعداد زیادی سلول با سرعت بالا اندازه گیری می شود. این روش به طور گسترده ای در زمینه تجزیه و تحلیل خون برای شناسایی انواع سلول های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. اولین سایتومتری که قادر به اندازه گیری خصوصیات الکتریکی سلول های منفرد بود توسط کولتر ساخته شد. این دستگاه با عبور سلول ها از یک میکروکانال مقاومت (سلول ها درون مایع بافر که از روی الکترودها عبور می کنند) را اندازه گیری می کند.

---

<sup>1</sup> Tris

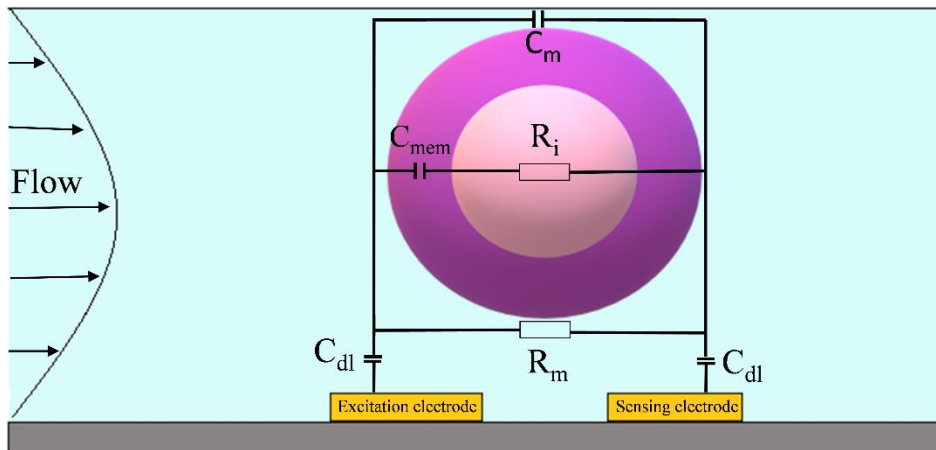
<sup>2</sup> Edta

<sup>3</sup> Borate

<sup>4</sup> Flow Cytometry

در یک میکروکانال با ابعاد ثابت می توان از تغییر امپدانس و جریان الکتریکی برای شمارش و اندازه گیری سلول ها استفاده کرد.

از روش های مختلفی برای مدل سازی خواص الکتریکی ذرات منفرد در حالت تعلیق استفاده می شود از جمله این روش می توان به تئوری مخلوط ماکسول، مدل مدار معادل و روش عنصر مرزی اشاره کرد.



شکل ۴-۱۸: مدل الکتریکی سلول در حالت تعلیق،  $R_m$  و  $C_m$  به ترتیب مقاومت و خازن محیط تعلیق،  $R_i$  و  $C_{mem}$  به ترتیب مقاومت هسته و خازن سیتوپلاسم می باشند

یک سلول در حالت تعلیق را می توان با یک مدار معادل (همانطور که در شکل ۴-۱۸ نشان داده شده است) مدل سازی کرد. در این مدار محیط سیال را با دو عنصر، یک خازن و یک مقاومت موازی و سلول را با یک مقاومت و خازن سری نمایش می دهند مقادیر مربوط به اجزای الکتریکی یک سلول منفرد به شرح زیر محاسبه می گردد.

$$R_m = \frac{1}{\sigma_m(1-3\phi/2)lk} \quad (7-4)$$

$$R_i = \frac{4\left(\frac{1}{2\delta_m} + \frac{1}{\delta_i}\right)}{9\phi lk} \quad (8-4)$$

$$C_{mem} = \frac{9\phi RC_{mem0}}{4} .lk \quad (9-4)$$

$$C_m = \varepsilon_\infty lk \quad (10-4)$$

که در این معادلات  $l$  طول الکترودها و  $k$  ضریب حجمی که نسبت ضریب گذردهی سلول به محیط می‌باشد و میزان  $C_{mem0}$  و  $\varepsilon_\infty$  به صورت زیر محاسبه می‌گردد

$$C_{mem0} = \frac{\varepsilon_{mem}}{d} \quad (11-4)$$

$$\varepsilon_\infty = \varepsilon_m \frac{2\varepsilon_m + \varepsilon_i - 2\phi(\varepsilon_m - \varepsilon_i)}{2\varepsilon_m + \varepsilon_i + \phi(\varepsilon_m - \varepsilon_i)} \quad (12-4)$$

سلول مورد بررسی در این پژوهش سلول سرطانی MCF-7 می‌باشد و مشخصات آن به صورت جدول زیر می‌باشد:

جدول ۴-۳: مشخصات سلول سرطانی MCF-7

مشخصات	$d$	$R$	$\delta_m$	$\varepsilon_m$	$\delta_{mem}$	$\varepsilon_{mem}$	$\delta_i$	$\varepsilon_i$
Mcf-7	۱۲	۱	۰/۱	۸۰	۰/۸	۶	۰/۰۰۱	۶۰
واحد	um	um	S/m	—	S/m	—	S/m	—

$dR$  به ترتیب ضخامت لایه اول و دوم سلول،  $\sigma_m$  و  $\sigma_{mem}$  به ترتیب ضریب هدایت لایه اول و دوم سلول،  $\varepsilon_m$  و  $\varepsilon_{mem}$  به ترتیب ضریب گذردهی لایه اول و دوم سلول می‌باشد.

#### ۴-۴-۶ محاسبه‌ی اجزای الکتریکی سلول سرطانی

با استفاده از روابط و خواص الکتریکی سلول سرطانی که در قسمت قبل توضیح داده شده‌است

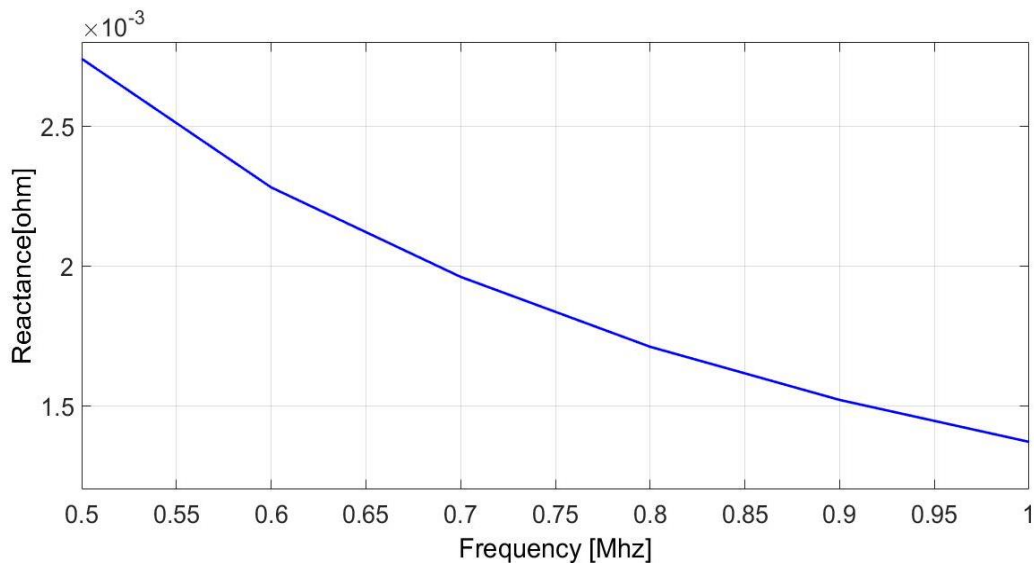
می‌توان اجزا مدار معادل سلول سرطانی را بدست آورد که به صورت جدول زیر می‌باشد

جدول ۴-۴: مقادیر مدار معادل

سلول	$R_i$	$R_m$	$C_{mem}$	$C_m$
Mcf-7	$400\text{K}\Omega$	$260\text{K}\Omega$	$116\mu\text{F}$	$0.9\text{pF}$

در فرکانس های پایین غشای سلول نازک باعث ایجاد یک امپدانس بزرگ می شود با افزایش فرکانس راکتانس خازن غشا مدار به صفر می رسد و خصوصیات داخلی سلول توسط مقاومت نشان داده می شوند. در این مدار فرض می شود که غشا دارای مقاومت بسیار بالایی است و ظرفیت سیتوپلاسمی نادیده گرفته می شود. همان طور که مشخص است  $C_m$  بسیار کوچک است و قابل صرف نظر است و  $C_{mem}$  را با افزایش فرکانس به سمت صفر میل می دهیم و می توان مدار معادل الکتریکی را دو مقاومت موازی در نظر گرفت که هر کدام نماینده مقاومت سیال و سلول می باشند

میزان امپدانس مختلط  $C_{mem}$  رابطه عکس با فرکانس اعمالی دارد در فرکانس های پایین میزان راکتانس خازن غشا مقدار قابل توجهی می باشد ولی در فرکانس های بالا مقدار این ظرفیت به صفر میل می کند که قابل صرف نظر است.

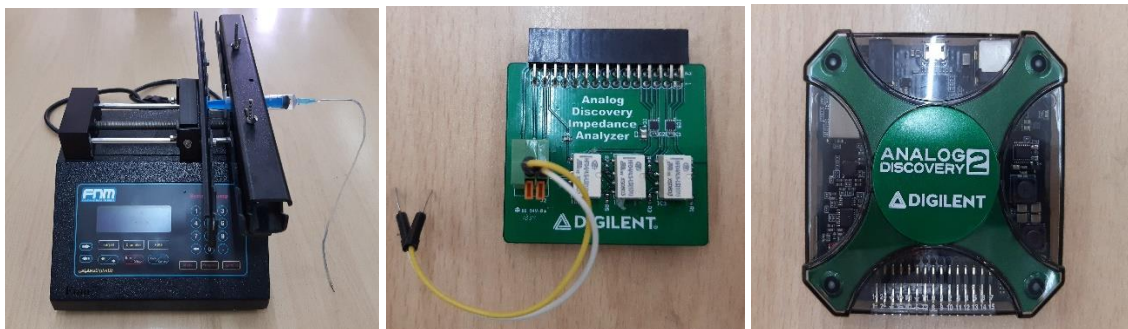


شکل ۴-۱۹: نمودار راکتانس خازن غشایی نسبت به فرکانس

همان گونه که در نمودار پیدا است با افزایش فرکانس میزان راکتانس خازن غشایی به صفر می‌رسد. در این سلول با اعمال فرکانس نزدیک به  $\omega$  مگاهرتز ظرفیت غشایی تقریباً صفر خواهد بود و می‌توان مدار معادل سلول را برابر با یک مقاومت در نظر گرفت که این امر موجب می‌شود با اندازه‌گیری میزان مقاومت سلول به شناسایی سلول هم برسیم در نتیجه سرعت شناسایی سلول افزایش پیدا می‌کند.

#### ۷-۴-۴ تجهیزات آزمایش

برای انجام آزمایش‌های مربوط به جداسازی و شناسایی ذرات مجموعه آزمایشگاهی مختلفی وجود دارد که در ادامه توضیح داده می‌شود. مجموعه آزمایشگاهی طراحی شده برای پدیده امپدانس فلوسایتومتری این مجموعه شامل منبع تغذیه برای تولید ولتاژ مورد نیاز و انجام محاسبات برخط توسط دستگاه مبدل آنالوگ، دستگاه امپدانس سنج الکتریکی، میکروسکوپ جهت مشاهده حرکت سیال، پمپ سرنگی جهت انتقال ذرات به میکروکانال و دوربین جهت ذخیره سازی فیلم و فرآیندها عکس می‌باشد. در برخی از آزمایشگاه‌ها برای بررسی بهتر فرایند شناسایی با توجه به اینکه بعضی از ذرات با استفاده از رنگ فلورسنت رنگ آمیزی می‌شوند تغییراتی در مجموعه ایجاد می‌کنند و میکروسکوپ فلورسنت را جایگزین میکروسکوپ معمولی می‌کنند.



(ج)

(ب)

(الف)

شکل ۴-۲۰: (الف) مبدل آنالوگ، (ب) امپدانس سنج، (ج) سرنگ مکانیکی

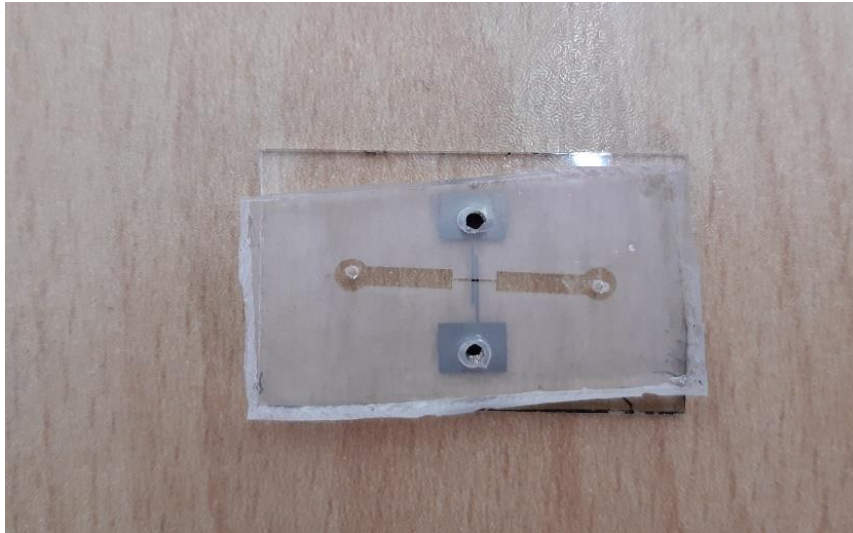
در این مجموعه پمپ سرنگی را داریم که سیال دارای سلول‌های سرطانی را با نرخ انتخابی به درون میکروکانال پمپاژ می‌کند دستگاه امپدانس سنج که متصل به دستگاه مبدل آنالوگ است میزان امپدانس ایجاد شده درون کانال را بررسی می‌کند و نتایج بدست آمده به وسیله مبدل آنالوگ از طریق کابل به کامپیوتر منتقل می‌شود و نمودار خروجی امپدانس داخل مانیتور نمایش داده می‌شود. نرم افزار مربوط به دستگاه مبدل آنالوگ در کامپیوتر قرار دارد و می‌توان تنظیمات مربوط به دستگاه مبدل آنالوگ (ولتاژ و فرکانس) را با استفاده از کابل به دستگاه مبدل آنالوگ انتقال داد.



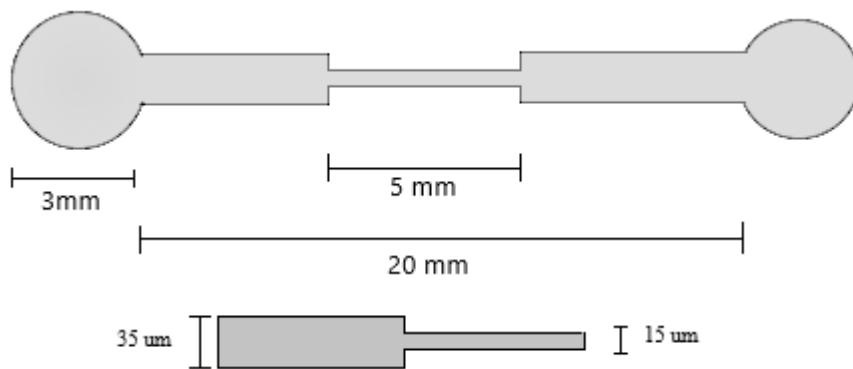
شکل ۴-۲۱: مجموعه تجهیزات پیاده سازی آزمایش به روش سایتومتری

#### ۴-۴-۸ نتایج و بحث

در این پژوهش سامانه‌ای را طراحی کردیم که می‌تواند خواص امپدانس سلول‌ها را یک باره و با سرعت زیاد جهت شناسایی سلول‌های سرطانی اندازه‌گیری کند. ریز تراشه از شیشه و کانال‌های میکروسیال از پلیمر PDMS ساخته شده و الکترودها از جنس تیتانیوم و نیکل است. میکروکانال دارای عمق ۲۰ میکرومتر و طول ۲۰ میلی‌متر است، الکترودها در وسط کانال قرار دارند و با ابعاد ۲۰ میکرومتر از همدیگر جدا شده‌اند.



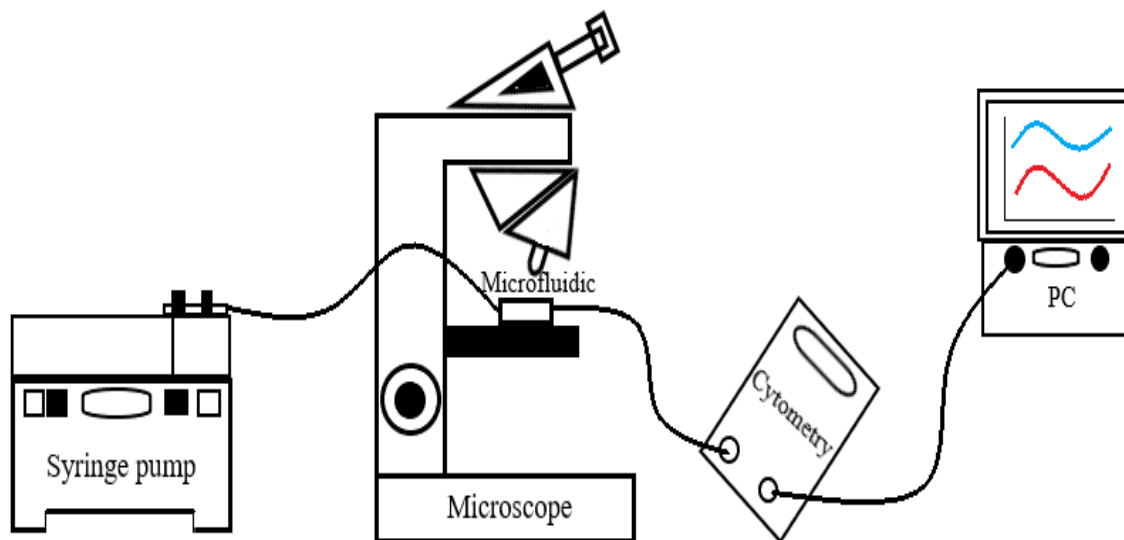
شکل ۴-۲۲: سامانه میکروفلوئیدیک نهایی



شکل ۴-۲۳: ابعاد سامانه میکروفلوئیدیک

#### ۹-۴-۴ شناسایی سلول سرطانی

آزمایش تجربی بروی میکروفلوئیدیک جهت شناسایی سلول‌های سرطانی گردشی از ۱۰ میلی لیتر مایع بافر PBS مخلوط با ۴ عدد سلول سرطانی در مدت زمان ۱۰ ثانیه انجام می‌شود سلول‌های سرطانی سینه به صورت کشت شده از آزمایشگاه‌های ژنتیک تهیه و در ۱۰ میلی لیتر محلول PBS با PH ۶/۸ مخلوط گردید است.



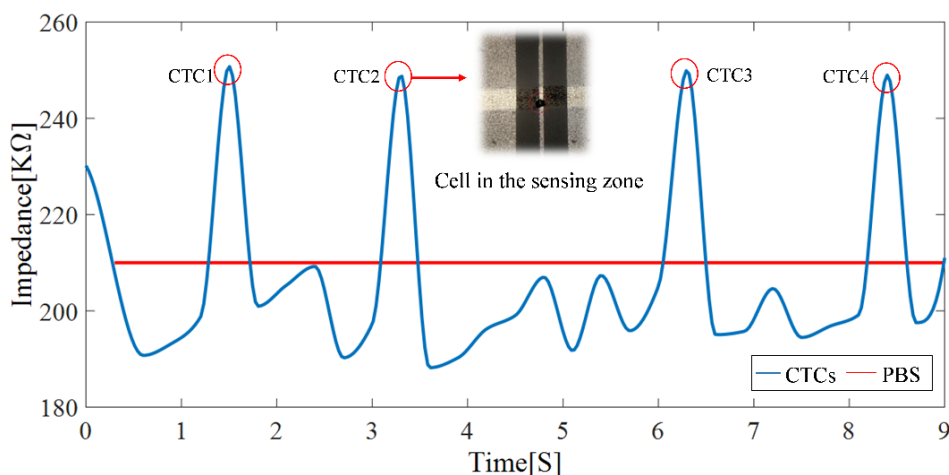
شکل ۴-۲۴: شماتیک مجموعه آزمایش شناسایی به روش فلوسایتومتری

در مرحله اول محلول PBS بدون اضافه کردن سلول‌های سرطانی در دو سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود از جنس تیتانیوم و نیکل مورد بررسی قرار می‌گیرد محلول PBS درون سرنگ مکانیکی ریخته شده و با نرخ سیالی ۱۰ میکرولیتر بر ثانیه از کانال اصلی عبور داده می‌شود مقدار امپدانس بدست آمده از این محلول در میکروفلوئیدیک با الکتروود نیکل برابر با ۲۱۰ کیلو اهم و در میکروفلوئیدیک با الکتروود تیتانیومی برابر ۴۰۰ کیلو اهم می‌باشد این مقدار امپدانس برای محلول بافر خالص و عاری از سلول سرطانی می‌باشد که با اضافه کردن سلول سرطانی مقدار امپدانس کاهش پیدا می‌کند (سلول‌های سرطانی مورد آزمایش به صورت کشت شده از آزمایشگاه ژنتیک انیسیتو کنسر بیمارستان امام خمینی تهران تهیه شده، ویال سلول سرطانی خالص نبوده و برای رشد سلول‌ها دارای مواد اسید آمینه، کربوهیدرات و مواد معدنی است).

در مرحله دوم سلول‌های سرطانی سینه در محلول مورد بررسی مخلوط می‌شوند و محلول PBS آماده شناسایی سلول‌های سرطانی می‌شود مایع بافر مخلوط با سلول‌های سرطانی درون سرنگ ریخته شده و داخل دستگاه سرنگ مکانیکی قرار می‌گیرد و با سرعت ۱۰ میکرولیتر بر ثانیه وارد میکروکانال

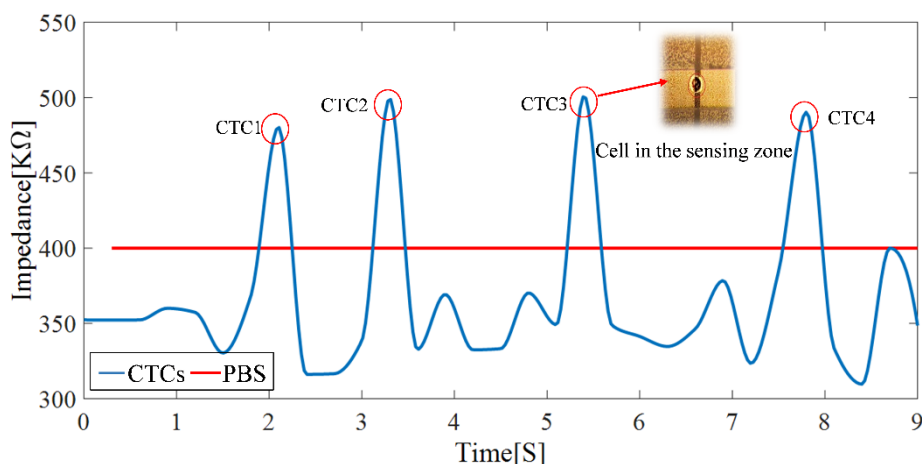
ساخته شده می‌شود در آخر دستگاه امپدانس متر با نرخ زمانی هر ۳۰۰ میلی ثانیه به بررسی وضعیت می‌پردازد انتظار می‌رود با عبور سلول‌های سرطانی از روی الکتروود پیک و یا قله‌هایی بر روی نمودار امپدانس خروجی مشاهده شود.

همان‌گونه که در شکل ۴-۲۵ پیدا است با اضافه کردن سلول‌ها به محلول بافر مقدار امپدانس از مقدار امپدانس محلول بافر خالص کمتر شده است با عبور سلول سرطانی از روی الکتروود شاهد ایجاد پیک و یا قله در نمودار امپدانس هستیم دلیل ایجاد این پیک مقاومت بیشتر سلول‌های سرطانی نسبت به بافر می‌باشد و این مقدار برابر با ۲۵۰ کیلو اهم است. سامانه میکروفلوئیدیک ساخته شده با الکتروود نیکل در مدت ۱۰ ثانیه ۴ سلول سرطانی سینه را شناسایی کرده و توانسته به بازدهی ۱۰۰ درصد برسد.



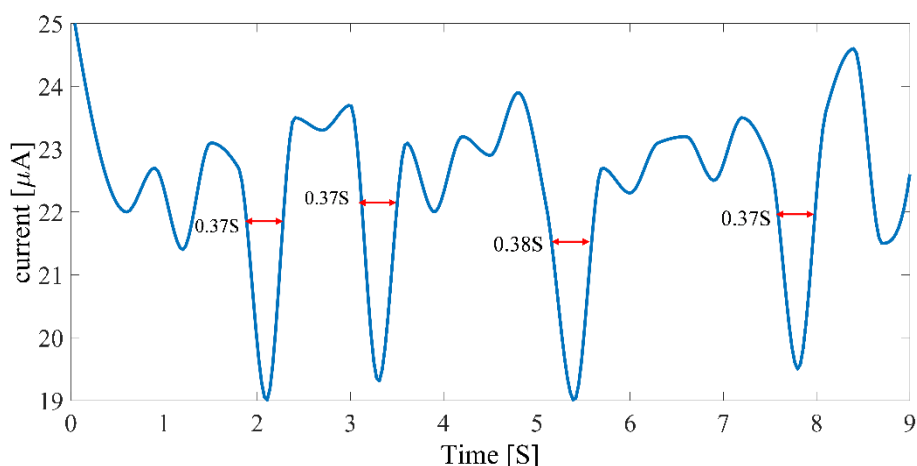
شکل ۴-۲۵: شناسایی سلول سرطانی در سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود نیکل

در ادامه محلول آماده شده بر روی سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود از جنس تیتانیوم مورد بررسی قرار می‌گیرد. مقدار امپدانس محلول خالص اندازه‌گیری شده در سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود تیتانیوم برابر ۴۰۰ کیلو اهم بوده و مقدار پیک امپدانس سلول سرطانی برابر با ۵۰۰ کیلو اهم می‌باشد تعداد سلول سرطانی شناسایی شده در مدت ۱۰ ثانیه برابر با ۴ عدد سلول سرطانی است و بازدهی ۱۰۰ درصد می‌باشد.



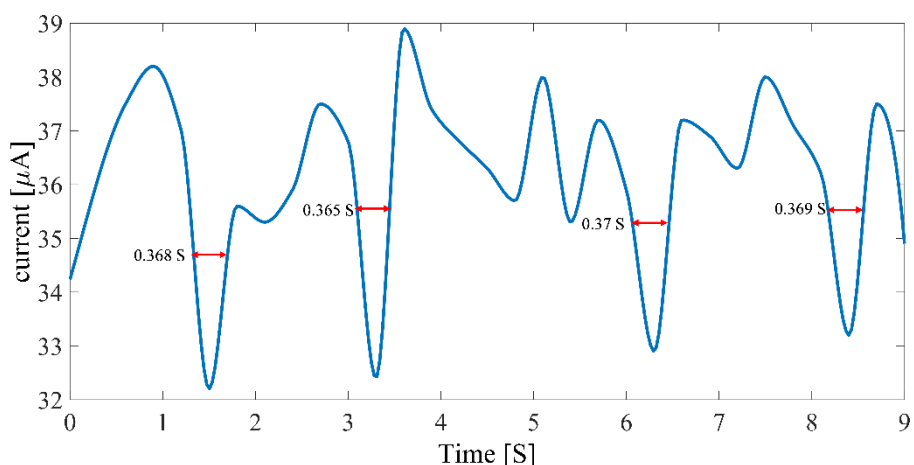
شکل ۴-۲۶: شناسایی سلول سرطانی در سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود تیتانیوم

مقدار امپدانس تاثیر مستقیمی بر جریان عبوری از سلول‌ها را دارند هر چقدر مقدار جریان عبوری از سلول‌ها کم باشد سلول‌ها کمتر مورد تنش الکتریکی قرار می‌گیرند و احتمال زنده ماندن سلول‌ها بیشتر می‌شود تا در ادامه کار بتوانند سلول‌ها را جداسازی کرده و نوع سرطان را شناسایی کنند. با توجه به محاسبات انجام شده مقدار امپدانس سلول‌های سرطانی بیشتر از محلول بافر می‌باشد و انتظار می‌رود زمان شناسایی سلول‌های سرطانی جریان کمتر (قعر داشته باشد) شود. همان طور در شکل ۴-۲۷ مشخص است در زمان شناسایی سلول سرطانی شاهد افزایش میزان امپدانس هستیم و دقیقا در همان زمان میزان جریان عبوری کاهشی می‌باشد، هنگامی که محلول بافر از روی الکتروود عبور می‌کند جریان در محدوده ۲۳ تا ۲۴ میکروآمپر متغیر است و زمانی که سلول سرطانی از روی الکتروود عبور می‌کند جریان برابر با ۲۱ میکروآمپر می‌شود. در ادامه کار همین مقدار از مایع با شرایط یکسان در سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود نیکل مورد بررسی قرار می‌گیرد.



شکل ۴-۲۷: مقدار جریان عبوری از سلول‌ها در سامانه میکروفلوئیدیک تیتانیوم

و در مرحله آخر به بررسی مقدار جریان عبوری از سلول در سامانه میکروفلوئیدیک از جنس نیکل می‌پردازیم، مقدار جریان هنگامی که محلول بافر از روی الکتروود عبور می‌کند در محدوده ۳۶ تا ۳۸ میکروآمپر متغیر است و زمانی که سلول سرطانی از روی الکتروود عبور می‌کند جریان برابر با ۳۳ میکروآمپر می‌شود. با بررسی کلی می‌توان به این نتیجه رسید که در زمان عبور سلول سرطانی از روی الکتروود نیکل در محدود ۳۳ میکروآمپر و الکتروود تیتانیوم ۲۱ میکروآمپر می‌باشد در نتیجه از لحاظ جریانی الکتروود تیتانیوم عملکرد بهتری نسبت به الکتروود نیکل دارد

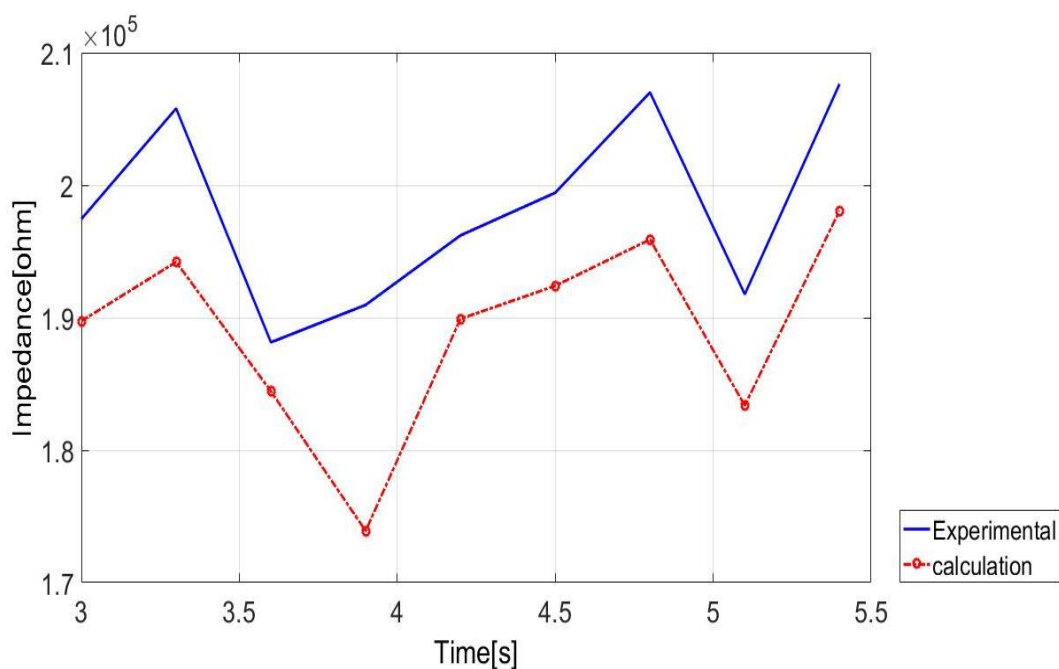


شکل ۴-۲۸: مقدار جریان عبوری از سلول‌ها در سامانه میکروفلوئیدیک نیکل

#### ۴-۴-۱۰ مقایسه نتایج حاصل از پیاده سازی سامانه با مدل

همان گونه که در بخش های قبل توضیح داده شده است مدار معادل الکتریکی سلول های سرطانی را می توان به صورت یک مقاومت و یک خازن سری در نظر گرفت، در این بخش به مقایسه مقدار آزمایش تجربی و محاسبه شده امپدانس سلول های سرطانی می پردازیم.

آزمایش در بازه زمانی ۳ تا ۶ میلی ثانیه با ولتاژ ثابت ۰/۱ ولت و فرکانس ۱ مگاهرتز انجام شده است محلول بافر ترکیب شده با سلول سرطانی و با استفاده از پمپ مکانیکی درون سامانه میکروفلوئیدیک تزریق می شود نتیجه بدست آمده از سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود نیکل به صورت زیر است. مقدار امپدانس بدست آمده از روش عددی نسبت به مقدار امپدانس بدست آمده از نظر تجربی دارای خطای ۵ درصد است.

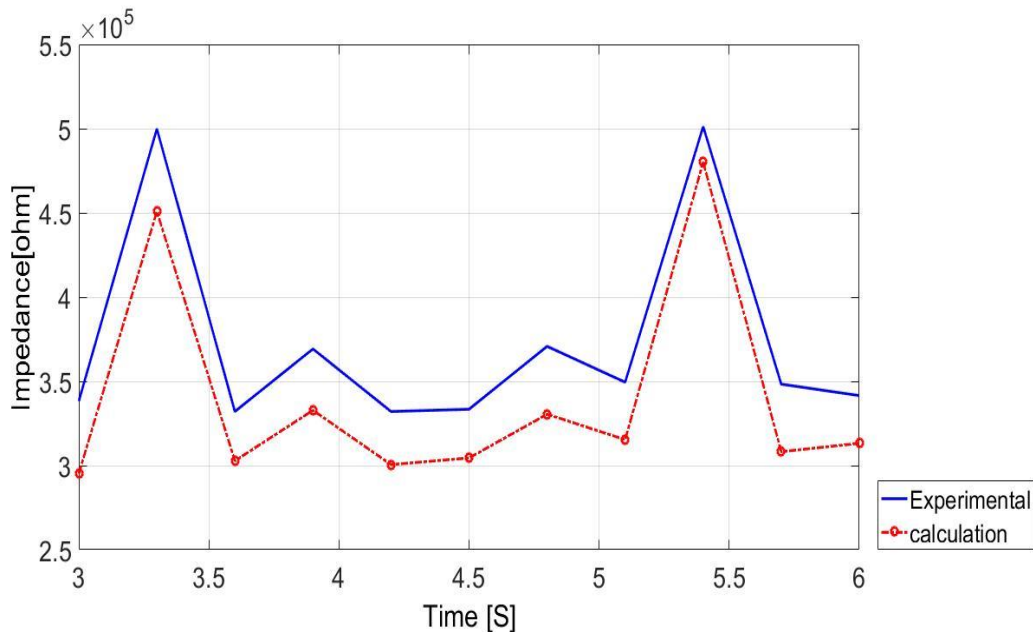


شکل ۴-۲۹: مقایسه امپدانس سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود نیکل

در ادامه آزمایش محلول بافری با مشخصات ثابت که بیان شده است در سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود تیتانیومی مورد بررسی قرار می گیرد. در آزمایش بر روی سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود جنس

تیتانیوم مقدار امپدانس بدست آمده از روش عددی نسبت به مقدار امپدانس بدست آمده از نظر تجربی

دارای خطای ۱۲ درصد می باشد



شکل ۴-۳۰: مقایسه امپدانس سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود تیتانیومی

با بررسی دو نمودار می توان به این نتیجه رسید که مقدار خطای اندازه گیری در سامانه میکروفلوئیدیک

با جنس الکتروود نیکل کمتر از سامانه میکروفلوئیدیک با الکتروود تیتانیومی می باشد.

#### ۴-۴-۱۱ جمع بندی و مقایسه

در قسمت شبیه سازی با محاسبه ی عدد رینولدز به آرام بودن جریان سیال در میکروکانال رسیده و در ادامه مشخصات الکتریکی ذرات و تاثیر میدان الکتریکی اعمالی بر ذرات توضیح داده شده است در گام بعدی هندسه ذرات، سرعت سیال، ابعاد کانال و فاصله الکتروودها از هم انتخاب شده است، در قسمت نتایج شبیه سازی پتانسیل الکتریکی، جریان سیال و میزان بازدهی جداسازی سلول های سرطانی از گلبول سفید خون مورد بررسی قرار می گیرد و در آخر جدول مقایسه ای بین ساختارهای دیگر و این ساختار تهیه شده است، در قسمت شبیه سازی سعی شده است عرض کانال و میزان ولتاژ اعمال جهت

ایجاد میدان الکتریکی نسبت به دیگر ساختارها کاهش پیدا کرده است.

جدول ۴-۵ مقایسه ساختارهای جهت جداسازی

ساختار	نوع ولتاژ	ولتاژ [V]	عرض کانال [μm]	سرعت [ $\frac{\mu m}{s}$ ]	بازدهای
کوآک [۶۴]	DC	۲۰	-	-	۸۷٪
پارک [۶۲]	DC	۱۰	۳۰	۱۳	۹۵٪
پومر [۶۱]	AC	۲۰۰	۱۰۰۰	۵	۹۹٪
ژنگ [۹۰]	DC	۲/۲	۲۵	۲۰	۹۹٪
این پژوهش	DC	۵	۲۰	۱۲	۱۰۰٪

در ادامه به روش‌های ساخت میکروفلوئیدیک و چگونگی ساخت الکترودها و میکروکانال توضیح داده شده است، در گام بعدی مدل مداری کانال دارای سیال شرح داده شده است و در آخر نتایج شناسایی سلول سرطانی و میزان جریان عبوری از سلول سرطانی مورد بررسی قرار می‌گیرد. جدول مقایسه ساختارها جهت شناسایی سلول سرطانی از نظر نوع نشانگر زیستی، نوع الکترودها و بازدهی مورد بررسی قرار گرفته که به شرح زیر است.

جدول ۴-۶ مقایسه ساختار جهت شناسایی

ساختار	نوع شناسایی	نشانگر شناسایی	نوع الکترودها	هزینه ساخت	بازدهای
ژن [۸۱]	امپدانس	سلول سرطانی	طلا	متوسط	۱۰۰٪
ژو [۸۲]	امپدانس	سلول سرطانی	طلا	متوسط	۱۰۰٪
شی [۸۳]	امپدانس	سلول سرطانی	طلا	متوسط	۱۰۰٪
هان [۷۴]	لیزر	اگزوزم	—	بالا	۹۵٪
سینا [۷۷]	لیزر	اسید نئوکلیک	—	بالا	۹۰٪
این پژوهش	امپدانس	سلول سرطانی	نیکل و تیتانیوم	کم	۱۰۰٪

در این پژوهش با بهره‌گیری از نشانگر زیستی و به روش امپدانس فلوسایتومتری به شناسایی سلول سرطانی پرداخته شده که با استفاده از الکترودهای نیکل و تیتانیوم هزینه ساخت را کاهش داده و به بازدهی ۱۰۰٪ رسیده‌ایم.



# فصل پنجم:

## جمع بندی، نتیجه گیری و ارائه پیشنهادها

## ۵-۱ جمع بندی

در این پژوهش ساخت سامانه میکروفلوئیدیک جهت تشخیص سلول سرطانی بر اساس امپدانس فلوسایتومتری ارائه شده است. پایان نامه موجود در قالب ۵ فصل به بررسی این موضوع پرداخته است. در فصل اول پس از معرفی موضوع و اهمیت تحقیق به معرفی سامانه میکروفلوئیدیک، نشانگرهای زیستی و امپدانس فلوسایتومتری به صورت اجمالی پرداخته شده است، در فصل دوم به صورت کامل سلول‌های سرطانی، تاریخچه و پیدایش سامانه میکروفلوئیدیک و تئوری روش امپدانس فلوسایتومتری بحث شده است. در فصل سوم روش‌های جداسازی و شناسایی سلول‌های سرطانی بصورت کامل مورد بررسی قرار گرفته و در فصل چهارم شبیه سازی سامانه میکروفلوئیدیک برای جداسازی سلول‌های سرطانی با استفاده از ترکیب کردن نیروی گریز از مرکز و نیروی دی الکتروفورسیس جهت جداسازی سلول‌های سرطانی از گلبول سفید خون مورد بررسی قرار گرفته است علاوه بر شبیه سازی کار ساخت سامانه میکروفلوئیدیک جهت شناسایی سلول سرطانی بر پایه امپدانس فلوسایتومتری به طور کامل هم از نظر روش ساخت سامانه، تئوری مسئله و آزمایش‌های تجربی بر روی سامانه مورد بحث قرار می‌گیرد.

### ۵-۱-۱ نتایج شناسایی سلول‌های سرطانی

طرح شناسایی سلول‌های سرطانی از دیگر اجزای خون با استفاده از روش امپدانس فلوسایتومتری در یک دستگاه میکروفلوئیدیک مورد بررسی قرار گرفت و با بهره گیری از تفاوت امپدانس سلول‌ها نسبت به محلول بافر شناسایی سلول‌های سرطانی بر مبنای امپدانس آن‌ها انجام گرفت. دستگاه میکروفلوئیدیک علاوه بر داشتن ساختار ساده دارای راندمان بالا در شناسایی، وارد کردن کمترین آسیب به سلول‌های سرطانی و سرعت تشخیص بالایی را دارد. در این پژوهش دستگاه ساخته شده با دو نمونه الکتروود از جنس تیتانیوم و نیکل می‌باشد تا نتایج دو دستگاه مورد مقایسه قرار گیرند.

• در بخش شناسایی سلول سرطانی با بهره‌گیری از دستگاه امپدانس متر که هر ۳۰۰ میلی ثانیه

به بررسی و پردازش اطلاعات می‌پرداخت بازدهی شناسایی در دو سامانه میکروفلوئیدیک ۱۰۰

درصد می‌باشد

- در بخش امیدانس، که در بازه زمانی ۳ تا ۶ ثانیه با ولتاژ ۰/۱ ولت در فرکانس ۱ مگاهرتز انجام شده است میزان درصد خطا الکتروود نیکل ۵ درصد بوده و میزان خطا الکتروود تیتانیومی ۱۲ درصد است که نشان می‌دهد درصد خطا الکتروود نیکل از الکتروود تیتانیوم کمتر است.
- در بخش جریان الکتریکی میزان جریان عبوری از سلول در الکتروود نیکل برابر با ۳۳ میکروآمپر و در الکتروود تیتانیوم برابر با ۲۱ میکروآمپر می‌باشد که در این آزمایش می‌توان به این نتیجه رسید که الکتروود تیتانیوم از نیکل جریان کمتری دارد.

با توجه به بررسی نتایج دستگاه ساخته شده به این نتیجه می‌رسیم که برای بدست آوردن امیدانس دقیق‌تر می‌توانیم از الکتروود نیکل استفاده کنیم و اگر به زنده ماندن سلول‌ها نیازی باشد تا در ادامه کار بررسی بیشتری شود باید از الکتروود تیتانیومی استفاده شود چون جریان کمتری از سلول‌ها عبور می‌دهد.

## ۵-۱-۲ نتایج جداسازی سلول‌های سرطانی

طرح جداسازی سلول‌های سرطانی از گلبول‌های سفید خون با استفاده از روش دی الکتروفورسیس در یک دستگاه میکرومیکسر جدید مورد بررسی قرار گرفت و با بهره‌گیری از نیروی سیال جهت متمرکز نمودن سلول‌ها جداسازی سلول‌های سرطانی بر مبنای شعاع آن‌ها انجام گرفت. دستگاه میکروسیالی علاوه بر داشتن ساختار ساده باید دارای راندمان بالا، کمترین آسیب به سلول‌های سرطانی و سرعت تشخیص بالایی داشته باشد برای میکروفلوئیدیک ارائه شده ساختار ساده‌تری نسبت به دیگر ساختارها ارائه شده است در این پژوهش سعی شده مقدار ولتاژ و سرعت سیال کاهش یابد، ولتاژ بیشیه برای اعمال به الکتروودها تا ۵ ولت کاهش پیدا کرده است تا لطمه‌ای به سلول‌های خونی وارد نشود و میزان زمان جداسازی سریعی نسبت به دیگر ساختارها را دارا می‌باشد. طرح ارائه شده برای این پژوهش قابلیت پیاده سازی در انواع دیگر دستگاه‌ها را داراست به طوری که می‌توان از آن در فرایندهای پزشکی و بالینی به صورت یک چیپ آزمایشگاهی استفاده نمود.

- در بخش میدان الکتریکی نتایج نشان داده‌است که نیروی دی الکتروفورسیس متأثر از شدت میدان الکتریکی و شعاع ذرات می‌باشد با افزایش میدان الکتریکی، نیروی دی الکتروفورسیس بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی تاثیر می‌گذارد و باعث جداسازی ذرات می‌شود.
- در بخش سرعت سیال نتایج نشان داده‌است که نیروی پسا تحت تاثیر سرعت‌های مختلف سیال می‌باشد و افزایش این نیرو باعث ایجاد تنش در ذرات می‌شود.
- در قسمت حرکت ذرات نتایج نشان می‌دهد که در بازه‌ی ولتاژ ۵ تا ۷ ولت بیشترین بازدهی را خواهیم داشت با افزایش ولتاژ میدان الکتریکی بیش از حد زیاد شده و باعث چسبیدن ذرات به الکتروود می‌شود، در قسمت سرعت سیال با کاهش سرعت از ۱۲ میکرومتر بر ثانیه ذرات به انتها کانال نمی‌رسند و جذب الکتروودها می‌شوند و با افزایش بیشتر از ۱۵ میکرومتر بر ثانیه باعث انسداد کانال می‌شود.

## ۲-۵ پیشنهادها

به طور حتمی مشخص است پژوهش انجام شده با محدودیت و کم و کاستی همراه بوده‌است که با برطرف کردن این مشکلات می‌توان انتظار عملکرد بهتر از این سامانه را داشت. با توجه به پژوهش انجام شده موارد ذیل جهت تحقیق در کارهای آینده پیشنهاد می‌شود.

- سامانه شبیه سازی شده با روش‌های لیتوگرافی و یا لیزر CNC ساخته شود و نتایج و عملکرد دستگاه با نتایج شبیه سازی مقایسه شود
- سامانه شبیه سازی شده را با استفاده از آهن ربای دائم باز طراحی کرده و نتایج آن مقایسه گردد
- سامانه میکروفلوئیدیک ساخته شده جهت تشخیص سلول‌های سرطانی می‌باشد، که از این سامانه می‌توان جهت تشخیص سلول‌های ایدز استفاده کرد، به این صورت که در کانال اصلی

منطقه‌ای ایجاد شود که مخزن نانو ذرات مغناطیسی باشد تا با عبور سلول‌های ایدز، نانوذرات مغناطیسی به ذرات چسبیده و در ادامه به روش امپدانس فلوسایتومتری شناسایی انجام شود.

- با استفاده از سامانه میکروفلوئیدیک ساخته شده می‌توان با ایجاد موانعی در کانال اصلی، سلول‌های عبوری بر روی الکتروود را نگه داشته و میزان مقاومت هر یک از ذرات مورد بحث به روش سایتومتری بدست آورد تا بتوانیم در ادامه کار نوع سلول سرطانی را تشخیص دهیم.

- [1] Herold, Keith E., and Avraham Rasooly. "Lab on a chip technology." (2009).
- [2] Pihl, Johan, et al. "Microfluidics for cell-based assays." *Materials today* 8.12 (2005): 46-51.
- [3] Melin, Jessica, and Stephen R. Quake. "Microfluidic large-scale integration: the evolution of design rules for biological automation." *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36 (2007): 213-231.
- [4] Kirby, Brian J. *Micro-and nanoscale fluid mechanics: transport in microfluidic devices*. Cambridge university press, 2010.
- [5] Gould, Paula. "Microfluidics realizes potential." *Materials today* 7.7-8 (2004): 48-52.
- [6] World Health Organization. "Global health observatory data repository. 2011. Number of deaths (World) by cause." (2015).
- [7] Ferlay, Jacques, et al. "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." *International journal of cancer* 136.5 (2015): E359-E386.
- [8] Medema, Jan Paul. "Cancer stem cells: the challenges ahead." *Nature cell biology* 15.4 (2013): 338-344.
- [9] Cohen, Steven J., et al. "Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer." (2008).
- [10] Ashworth, T. R. "A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death." *Aust Med J.* 14 (1869): 146.
- [11] Stroun, M., et al. "About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release." *Clinica chimica acta* 313.1-2 (2001): 139-142.
- [12] Haber, Daniel A., and Victor E. Velculescu. "Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA." *Cancer discovery* 4.6 (2014): 650-661.

- [13] Kerachian, Mohammad Amin, Ali Poudineh, and Jean Paul Thiery. "Cell free circulating tumor nucleic acids, a revolution in personalized cancer medicine." *Critical reviews in oncology/hematology* 144 (2019): 102827.
- [14] Schwarzenbach, Heidi, et al. "Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer." *Clinical Cancer Research* 15.3 (2009): 1032-1038.
- [15] Thierry, A. R., et al. "Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology." *Cancer and metastasis reviews* 35.3 (2016): 347-376.
- [16] Barbany, G., et al. "Cell-free tumour DNA testing for early detection of cancer—a potential future tool." *Journal of internal medicine* 286.2 (2019): 118-136.
- [17] Medema, Jan Paul. "Cancer stem cells: the challenges ahead." *Nature cell biology* 15.4 (2013): 338-344.
- [18] Fidler, Isaiah J. "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." *Nature reviews cancer* 3.6 (2003): 453-458.
- [19] Pantel, Klaus. "Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating cancer cells in breast cancer patients." (2009): P2-1
- [20] Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. "Hallmarks of cancer: the next generation." *cell* 144.5 (2011): 646-674.
- [21] Schwarzenbach, Heidi, Dave SB Hoon, and Klaus Pantel. "Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients." *Nature Reviews Cancer* 11.6 (2011): 426-437.
- [22] Kim, Mi-Young, et al. "Tumor self-seeding by circulating cancer cells." *Cell* 139.7 (2009): 1315-1326.
- [23] Aguirre-Ghiso, Julio A. "On the theory of tumor self-seeding: implications for metastasis progression in humans." *Breast Cancer Research* 12.2 (2010): 304.
- [24] Okumura, Yoshitomo, et al. "Circulating tumor cells in pulmonary venous blood of primary lung cancer patients." *The Annals of thoracic surgery* 87.6 (2009): 1669-1675.
- [25] Dong, Yi, et al. "Microfluidics and circulating tumor cells." *The Journal of Molecular Diagnostics* 15.2 (2013): 149-157.
- [26] Reguera, Javier, et al. "Anisotropic metal nanoparticles for surface enhanced Raman scattering." *Chemical Society Reviews* 46.13 (2017): 3866-3885.
- [27] Anbari, Alimohammad, et al. "Microfluidic model porous media: fabrication and applications." *Small* 14.18 (2018): 1703575.

- [28] Luo, Guangsheng, et al. "Recent developments in microfluidic device-based preparation, functionalization, and manipulation of nano-and micro-materials." *Particuology* (2019).
- [29] Matas, J. P., J. F. Morris, and Elisabeth Guazzelli. "Lateral forces on a sphere." *Oil & gas science and technology* 59.1 (2004): 59-70.
- [30] Jeffrey, R. Co, and J. R. A. Pearson. "Particle motion in laminar vertical tube flow." *Journal of Fluid Mechanics* 22.4 (1965): 721-735.
- [31] Jeffrey, R. Co, and J. R. A. Pearson. "Particle motion in laminar vertical tube flow." *Journal of Fluid Mechanics* 22.4 (1965): 721-735.
- [32] Zhou, Jian, and Ian Papautsky. "Fundamentals of inertial focusing in microchannels." *Lab on a Chip* 13.6 (2013): 1121-1132.
- [33] Norouzi, M., and N. Biglari. "An analytical solution for Dean flow in curved ducts with rectangular cross section." *Physics of Fluids* 25.5 (2013): 053602.
- [34] Martel, Joseph M., and Mehmet Toner. "Inertial focusing in microfluidics." *Annual review of biomedical engineering* 16 (2014): 371-396.
- [34] Valencia, Pedro M., et al. "Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles." *Nature nanotechnology* 7.10 (2012): 623.
- [35] Mukhopadhyay, Subhadeep, and J. P. Banerjee. "Review on theoretical background, fabrication techniques, methodologies and applications of Microfluidic devices and Nanofluidic devices." *Journal of Nanoscience, Nanoengineering and Applications* 5.3 (2015): 19-34p.
- [36] Krüger, Jan, et al. "Development of a microfluidic device for fluorescence activated cell sorting." *Journal of micromechanics and microengineering* 12.4 (2002): 486.
- [37] Cole, Kenneth S., and Howard J. Curtis. "Electric impedance of single marine eggs." *The Journal of general physiology* 21.5 (1938): 591
- [38] Cole, Kenneth S., and Rita M. Guttman. "Electric impedance of the frog egg." *The Journal of general physiology* 25.5 (1942): 765-775
- [39] Evander, Mikael, et al. "Microfluidic impedance cytometer for platelet analysis." *Lab on a Chip* 13.4 (2013): 722-729
- [40] Asami, Koji. "Characterization of biological cells by dielectric spectroscopy." *Journal of Non-Crystalline Solids* 305.1-3 (2002): 268-277.
- [41] Morgan, Hywel, et al. "Single cell dielectric spectroscopy." *Journal of Physics D: Applied Physics* 40.1 (2006): 61.

- [42] Gawad, Shady, et al. "Dielectric spectroscopy in a micromachined flow cytometer: theoretical and practical considerations." *Lab on a Chip* 4.3 (2004): 241-251.
- [43] Hong, Jih-Lin, Kung-Chieh Lan, and Ling-Sheng Jang. "Electrical characteristics analysis of various cancer cells using a microfluidic device based on single-cell impedance measurement." *Sensors and Actuators B: Chemical* 173 (2012): 927-934.
- [44] Ruemenapp, Christine, et al. "Improved method for impedance measurements of mammalian cells." *Biosensors and Bioelectronics* 24.9 (2009): 2915-2919.
- [45] Huang, Song-Bin, et al. "A clogging-free microfluidic platform with an incorporated pneumatically driven membrane-based active valve enabling specific membrane capacitance and cytoplasm conductivity characterization of single cells." *Sensors and Actuators B: Chemical* 190 (2014): 928-936.
- [46] Vona, Giovanna, et al. "Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells." *The American journal of pathology* 156.1 (2000): 57-63
- [47] S. C. t. Canada, "The Typical RosetteSep™ Protocol," <https://www.stemcell.com/products/brands/rosettesep.html>(website), 2017
- [48] Zheng, Siyang, et al. "3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood." *Biomedical microdevices* 13.1 (2011): 203-213.
- [49] Tan, Swee Jin, et al. "Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood." *Biomedical microdevices* 11.4 (2009): 883-892.
- [50] Park, Emily S., et al. "Continuous flow deformability-based separation of circulating tumor cells using microfluidic ratchets." *Small* 12.14 (2016): 1909-1919.
- [51] Sarioglu, A. Fatih, et al. "A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters." *Nature methods* 12.7 (2015): 685.
- [52] Qin, Xi, et al. "Size and deformability based separation of circulating tumor cells from castrate resistant prostate cancer patients using resettable cell traps." *Lab on a Chip* 15.10 (2015): 2278-2286.
- [53] Leary, James F. "Ultra high-speed sorting." *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 67.2 (2005): 76-85.
- [54] Di Carlo, Dino. "Inertial microfluidics." *Lab on a Chip* 9.21 (2009): 3038-3046.

- [55] Stott, Shannon L., et al. "Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.43 (2010): 18392-18397.
- [56] Wang, Shunqiang, et al. "Geometry design of herringbone structures for cancer cell capture in a microfluidic device." *Microfluidics and Nanofluidics* 20.11 (2016): 148.
- [57] Kim, Tae-Hyeong, et al. "FAST: size-selective, clog-free isolation of rare cancer cells from whole blood at a liquid-liquid interface." *Analytical chemistry* 89.2 (2016): 1155-1162.
- [58] Qin, Xi, et al. "Size and deformability based separation of circulating tumor cells from castrate resistant prostate cancer patients using resettable cell traps." *Lab on a Chip* 15.10 (2015): 2278-2286.
- [59] Kang, Yuejun, et al. "DC-Dielectrophoretic separation of biological cells by size." *Biomedical microdevices* 10.2 (2008): 243-249.
- [60] Chou, Wen-Pin, et al. "The utilization of optically-induced-dielectrophoresis (ODEP)-based virtual cell filters in a microfluidic system for continuous isolation and purification of circulating tumour cells (CTCs) based on their size characteristics." *Sensors and Actuators B: Chemical* 241 (2017): 245-254.
- [61] M.S. Pommer, Y. Zhang, N. Keerthi, D. Chen, J.A. Thomson, C.D. Meinhart, H.T. Soh, Dielectrophoretic separation of platelets from diluted whole blood in microfluidic channels, *Electrophoresis*, 29(6) (2008) 1213-1218.
- [62] S. Park, Y. Zhang, T.-H. Wang, S. Yang, Continuous dielectrophoretic bacterial separation and concentration from physiological media of high conductivity, *Lab on a Chip*, 11(17) (2011) 2893-2900
- [63] Lee, Tae Yoon, et al. "An integrated microfluidic chip for one-step isolation of circulating tumor cells." *Sensors and Actuators B: Chemical* 238 (2017): 1144-1150.
- [64] Kwak, Bongseop, et al. "Selective isolation of magnetic nanoparticle-mediated heterogeneity subpopulation of circulating tumor cells using magnetic gradient based microfluidic system." *Biosensors and Bioelectronics* 88 (2017): 153-158.
- [65] Yang, Jun, et al. "A microfluidic device for rapid quantification of cell-free DNA in patients with severe sepsis." *Lab on a Chip* 15.19 (2015): 3925-3933.
- [66] Zhang, Zhifeng, Xiaolin Chen, and Jie Xu. "Entry effects of droplet in a micro confinement: Implications for deformation-based circulating tumor cell microfiltration." *Biomicrofluidics* 9.2 (2015): 024108.

- [67] Sonnenberg, Avery, et al. "Dielectrophoretic isolation and detection of cancer-related circulating cell-free DNA biomarkers from blood and plasma." *Electrophoresis* 35.12-13 (2014): 1828-1836.
- [68] Lurton, Xavier. *An introduction to underwater acoustics: principles and applications*. Springer Science & Business Media, 2002.
- [69] Warkiani, Majid Ebrahimi, et al. "Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells." *Lab on a Chip* 14.1 (2014): 128-137.
- [70] Petersen, Kevin E., et al. "A review of exosome separation techniques and characterization of B16-F10 mouse melanoma exosomes with AF4-UV-MALS-DLS-TEM." *Analytical and bioanalytical chemistry* 406.30 (2014): 7855-7866.
- [71] Lee, Kyunghoon, et al. "Acoustic purification of extracellular microvesicles." *ACS nano* 9.3 (2015): 2321-2327.
- [72] Krüger, Jan, et al. "Development of a microfluidic device for fluorescence activated cell sorting." *Journal of micromechanics and microengineering* 12.4 (2002): 486.
- [73] Orfao, Alberto, and Alejandro Ruiz-Argüelles. "General concepts about cell sorting techniques." *Clinical biochemistry* 29.1 (1996): 5-9.
- [74] Alix-Panabières, Catherine, Heidi Schwarzenbach, and Klaus Pantel. "Circulating tumor cells and circulating tumor DNA." *Annual review of medicine* 63 (2012): 199-215.
- [75] Haandbæk, Niels, et al. "Resonance-enhanced microfluidic impedance cytometer for detection of single bacteria." *Lab on a Chip* 14.17 (2014): 3313-3324.
- [76] Zheng, Yi, et al. "Recent advances in microfluidic techniques for single-cell biophysical characterization." *Lab on a Chip* 13.13 (2013): 2464-2483.
- [77] Morales-Kastresana, Aizea, et al. "Labeling extracellular vesicles for nanoscale flow cytometry." *Scientific reports* 7.1 (2017): 1-10.
- [78] Löf, Liza, et al. "Detecting individual extracellular vesicles using a multicolor in situ proximity ligation assay with flow cytometric readout." *Scientific reports* 6 (2016): 34358.
- [79] Katsumoto, Yoichi, et al. "Electrical classification of single red blood cell deformability in high-shear microchannel flows." *International Journal of Heat and Fluid Flow* 31.6 (2010): 985-995.
- [80] Holmes, David, and Hywel Morgan. "Single cell impedance cytometry for identification and counting of CD4 T-cells in human blood using impedance labels." *Analytical chemistry* 82.4 (2010): 1455-1461.

- [81] Chen, Jian, et al. "Classification of cell types using a microfluidic device for mechanical and electrical measurement on single cells." *Lab on a Chip* 11.18 (2011): 3174-3181.
- [82] Zhao, Yang, et al. "A microfluidic system for cell type classification based on cellular size-independent electrical properties." *Lab on a Chip* 13.12 (2013): 2272-2277.
- [83] Shi, Leilei, and Leyla Esfandiari. "An electrokinetically-driven microchip for rapid entrapment and detection of nanovesicles." *Micromachines* 12.1 (2021): 11.
- [84] Kadaksham, J., P. Singh, and N. Aubry. "Manipulation of particles using dielectrophoresis." *Mechanics Research Communications* 33.1 (2006): 108-122.
- [85] Bruus, Henrik. *Theoretical microfluidics*. Vol. 18. Oxford: Oxford university press, 2008.
- [86] Nerguizian, Vahé, et al. "Analytical solutions and validation of electric field and dielectrophoretic force in a bio-microfluidic channel." *Electrophoresis* 33.3 (2012): 426-435.
- [87] Tatsumi, K., et al. "Analysis and measurement of dielectrophoretic manipulation of particles and lymphocytes using rail-type electrodes." *Medical engineering & physics* 38.1 (2016): 24-32.
- [88] Egger, Marcel, and Edwin Donath. "Electrorotation measurements of diamide-induced platelet activation changes." *Biophysical journal* 68.1 (1995): 364-372.
- [89] Choi, Yong-Seok, Kyung-Won Seo, and Sang-Joon Lee. "Lateral and cross-lateral focusing of spherical particles in a square microchannel." *Lab on a Chip* 11.3 (2011): 460-465.
- [90] Zhang, Xiangzhi, et al. "Numerical simulation of circulating tumor cell separation in a dielectrophoresis based YY shaped microfluidic device." *Separation and Purification Technology* 255 (2021): 117343.

# سوست

## ۱- دستگاه کندوپاش

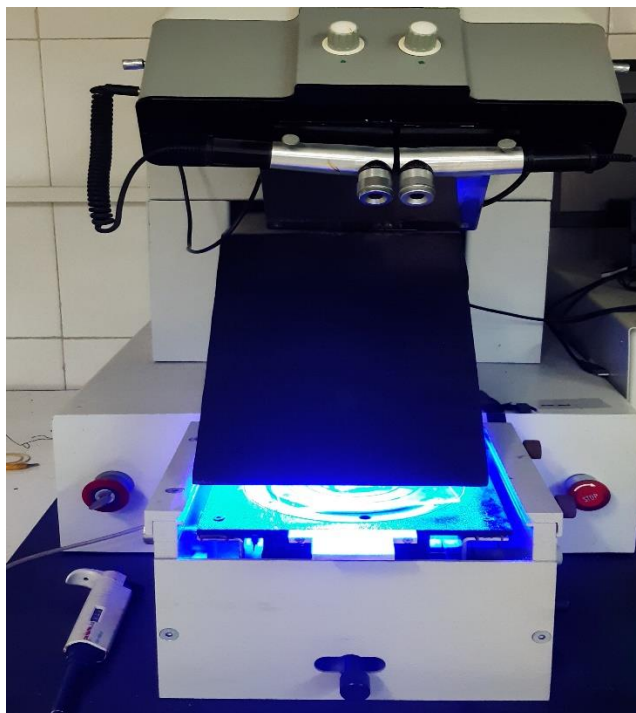
یکی از روش‌های لایه نشانی از فاز بخار است که به‌طور عمده برای تولید فیلم فلزات، در ابعاد نانومتر تا میکرومتر استفاده می‌شود، اما فرایند اسپاترینگ عبارتست از کندوپاش اتم‌های یا مولکول‌های منبع یا هدف و ایجاد یک فیلم با یون‌های یک گاز خنثی که در پلاسما ایجاد شده، مانند سایر روش‌های لایه نشانی فیزیکی تحت شرایط خلأ، روش کندوپاش نیز شامل سه مرحله تبخیر ماده منبع، انتقال بخار از منبع به جسم و تشکیل لایه نازک روی جسم با انباشت بخار منبع مورد نظر است.



شکل ۱: دستگاه کندوپاش

## ۲- دستگاه لیتوگرافی

دستگاه لیتوگرافی تابش‌گر نور فرابنفش می‌باشد، که از این دستگاه جهت تابیدن نور فرابنفش بر روی ماده فتورزیست استفاده می‌شود. معمولاً دستگاه‌های لیتوگرافی دارای لامپ فرابنفش هستند، که می‌توانند مقدار مشخصی از انرژی بر واحد زمان تولید کنند. در این دستگاه ماسکی که دارای طرح مدنظر است به همراه زیر لایه درون دستگاه لیتوگرافی قرار می‌گیرد، پس از تابیدن نور فرابنفش به ماده مقاوم (بسته به مثبت یا منفی بودن) استحکام آن کم یا زیاد می‌شود لذا رفتار آن در برابر محلول شیمیایی متفاوت خواهد بود، و الگوی ماسک بر روی زیر لایه به وجود خواهد آمد.



شکل ۲: دستگاه نوردهی فرابنفش

### ۳- دستگاه لایه نشانی چرخشی

از این دستگاه برای پوشش دهی سطح زیر لایه به وسیله فتورزیست استفاده می‌شود، این دستگاه به یک پمپ خلا متصل می‌شود که زیر لایه را بر روی آن نگه می‌دارد، سپس به مقدار مناسبی ماده فتورزیستور بر روی آن ریخته می‌شود و بسته به ضخامتی که میکروکانال مورد نظر قرار است داشته باشد، با سرعت دورانی خاصی شروع به حرکت می‌کند، و پس از اتمام چرخش، فتورزیست بر روی زیر لایه به طور مناسبی پخش شده‌است.



شکل ۳: دستگاه لایه نشانی چرخشی

#### ۴- دستگاه زدایش عمیق یونی راکتیو

از این دستگاه برای زدایش خشک و چسباندن میکروکانال تهیه شده به شیشه استفاده می‌شود، این دستگاه با اتصال به پمپ خلا به شرایط خلا می‌رسد و با فعال شدن امواج ماکروویو در این شرایط محیط پلاسما زیر لایه سیلیکون را زدایش و یا برای اتصال به شیشه فعال می‌کند.



شکل ۴: دستگاه زدایش عمیق یونی راکتیو



# Abstract

Circulation of tumor cells is an important indicator for different types of cancer, because circulating tumor cells are very rare in the bloodstream. Accurate analysis and isolation of circulating tumor cells is a challenging task. One of the methods to identify tumor cells is to isolate them from other blood components. In the simulation section, using Comsol software and using a combination of dielectrophoresis and escape force, try to isolate the tumor cells. Has been circulating. In this experiment, by creating square barriers in the main channel of centrifugal force and by applying a direct voltage of 5V, an electric field required by the force of dielectrophoresis is created. The centrifuges are set to 0.027 N The particles then enter the main channel and are affected by the dielectric force of 0.5 N based on the size of the separation radius. Efficiency in this method It is 99% for cancer cells. Using the difference in resistance between the cancer cell and the buffer solution, the cancer cell is identified by flow cytometry impedance method. The resistance of the cancer cells is higher than the buffer solution and the current passing through the cancer cells is less than the solution. It is a buffer, so by calculating the amount of electrical resistance, we can identify each cancer cell. In this study, we designed a system that can measure the impedance properties of cells at once and at high speed to identify cancer cells, glass microchips and titanium and nickel electrodes and microfluidic channels of PDMS polymer They are made, the microchannel is 20um deep and the electrodes are separated by 20um. Experimental microfluidic examination is performed to identify circulating cancer cells from 10 ml of PBS buffer fluid mixed with 4 cancer cells in 10 seconds. Breast cancer cells are prepared and cultured from genetic laboratories. In 10 ml of PBS solution is mixed with a pH of 6.8, and finally the cancer cell detection efficiency is 100% and the current passing through the cancer cells in the electrode with titanium is less than nickel and has a better performance.

**Keywords:** Cancer cell isolation, Cancer cell identification, Flow cytometry impedance, Dielectrophoresis, Comsol



Shahrood University of Technology

**Electrical Engineering Department**

**M.Sc. Thesis in Micro and Nano Electronic Devices Engineering**

**Design and fabrication of microfluidic  
system for cancer cell detection based  
on impedance flow cytometry**

By  
**Alireza Alaghemand**

Supervisor  
**Dr. Fattah**

September 2021