

## MODELAREA ȘI SIMULAREA UNUI DISPOZITIV MICROFLUIDIC PENTRU ANALIZA LEUCOCITELOR

### MODELING AND SIMULATION OF A MICROFLUIDIC DEVICE FOR LEUKOCYTE ANALYSIS

CÎRSTINA Maria-Mihaela, DECA Anca-Loredana, NEACȘU Alexandru-Ionuț  
Facultatea: IIR, Specializarea: TCM, Anul de studii: IV, e-mail: cirstinamihaela97@gmail.com

Conducător științific: Prof. Dr. Ing. **Daniel GHICULESCU**

*ABSTRACT: The paper deals with the modeling and simulation of lab-on-a-chip microfluidic device is used for counting leukocytes in blood samples. Some aspects regarding the development stages of lab-on-a-chip devices are shown, which are extremely useful in the current pandemic conditions due to the rapidity of providing analysis results and the opportunity to perform certain determinations that are impossible using current conventional equipment. Comsol Multiphysics was used for finite element modeling and simulating device working, and for its geometric optimization. The velocities and the required travel time of the blood sample, the lysing and stop lysing substances, within two circuits are considered. These are formed by multiple coils with two counting channels of two cell types and a cells capture chamber. The conditions for the execution of the device were created on a millimeter silicon wafer using photochemical microtechnologies.*

*CUVINTE CHEIE: microfluide, leucocite, microtehnologii fotochimice.*

#### 1. Introducere

Acronimul pentru Sistemele Micro-Electro-Mecanice este “MEMS” (Micro Electro Mechanical Systems) și a fost adoptat oficial în 1989 de Dr. Albert P. Pisano. Acesta a folosit termenul “MEMS” pentru a descrie structurile rezonante care au fost fabricate pentru stabilizatori de frecvență [1].

Microsistemul de analiză cunoscut și sub numele de „lab-on-a-chip” a fost propus la începutul anilor 1990. Fluxul de fluide în dispozitivele microfluidice prezintă proprietăți diferite datorită scalării, de la 0,1  $\mu\text{m}$  la 1 mm [2].

Globulele albe sau *leucocitele* includ neutrofilele, *limfocitele*, monocitele, bazofilele, eozinofilele și trombocitele. În prezenta lucrare a fost analizată curgerea microfluidelor necesare, pentru realizarea unui MEMS folosit la determinarea numărului de *limfocite de tip T* dintr-o probă de sânge (denumite astfel pentru că se maturizează în *timus* și care nu pot fi numărate cu ajutorul mijloacelor de analiză convenționale) și care au un rol major în răspunsul imunitar prin atacul asupra celulelor infectate de viruși [5].

#### 2. Stadiul actual

Pentru realizarea unui dispozitiv de tip MEMS se apelează la litografie, care reprezintă transferul unui model de pe un material fotosensibil prin expunere selectivă la o sursă de radiație [3].

Sângele este alcătuit dintr-o parte lichidă, plasma sanguină, care conține 90% apă, în care plutesc o serie de celule specifice sângelui, țesut lichid de origine mezenchimală, în care se găsesc *elementele figurate* (eritrocitele, leucocitele și trombocitele) [5].

Dispozitivul microfluidic a fost creat cu intenția de a observa la nivel “micro” modificările survenite celulelor din sânge datorate diferitelor boli. Tehnologiile microfluidice sunt o alternativă a metodelor tradiționale de detectare a celulelor în fluide [2].

Geometria unui sistem microfluidic este determinată de următorii parametri (utilizați și la modelarea dispozitivului din lucrarea de față), conform fig. 1: lățimea canalului central ( $W_c$ ); lățimea canalului lateral ( $W_l$ ); adâncimea canalului ( $h$ ); unghiul de intersecție ( $\alpha$ ) dintre canale.

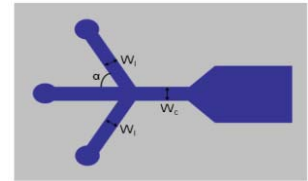


Fig. 1. Parametrii geometrici ai canalului

Matrițele sunt realizate cu ajutorul procesului de fotolitografie (v. fig. 2) fiind realizat într-o cameră curată cu lumină fără ultraviolete pentru evitarea solidificării accidentale a rășinii fotosensibile la această radiație. Forma canalului se realizează cu ajutorul elastomerului PDMS care vine în contact cu o bucată de sticlă (figura 3) [6].

Schema unui dispozitiv microfluidic și modul său de funcționare este prezentată în fig. 4: sângele este introdus în prima intrare (i), împreună cu o soluție de lizare, a doua intrare (ii). Cu ajutorul soluției, sângele circulă prin canalele dispozitivului, ajungând să fie măsurat numărul de celule care au intrat de către un senzor (iii), unele din acestea vor rămâne în camera de captură (iv), având dimensiuni mai mari și astfel, se vor număra celulele care trec de dimensiuni mai mici, la ieșirea (v) [7].

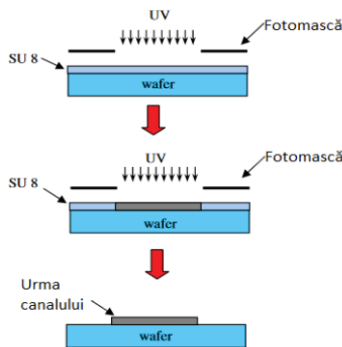


Fig. 2. Fabricarea prin fotolitografie a unui canal [6]

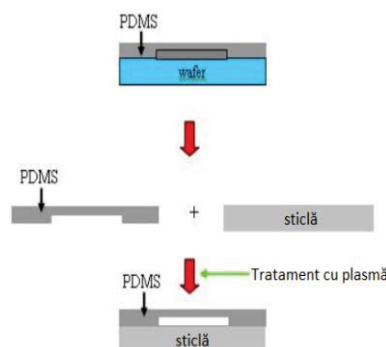


Fig. 3. Realizarea unui microcanal cu PDMS/Sticlă [6]

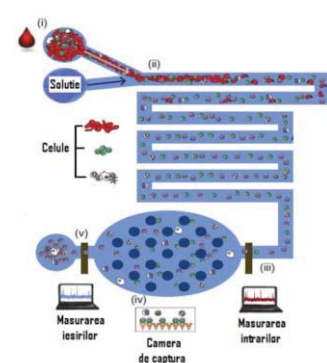


Fig. 4. Schema de principiu a dispozitivului [7]

Modelarea curgerii fluidelor în acest caz, are la bază principiul lui Bernoulli (figura 5), care afirmă că presiunea totală în lungul unei linii de curent într-un fluid incompresibil și lipsit de vâscozitate, aflat în curgere staționară, este constantă, conform relației:

$$\frac{v^2}{2} + g \cdot z + \frac{p}{\rho} = \text{constant} \quad (1)$$

unde:  $v$  - viteza de curgere a fluidului într-un punct pe o linie superioară;  $g$  - accelerația datorată gravitației;  $p$  - presiunea la punctul ales;  $\rho$  - densitatea fluidului în toate punctele.

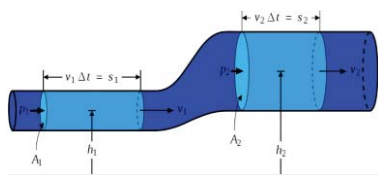


Fig. 5. Legea lui Bernoulli [8]

Principiul lui Bernoulli poate fi derivat din principiul conservării energiei. Dacă fluidul curge dintr-un rezervor, suma tuturor formelor de energie este aceeași pe toate liniile de flux, deoarece într-un rezervor energia per volum de unitate este aceeași peste tot [8].

### 3. Modelarea și simularea dispozitivului microfluidic

Cu ajutorul programului Comsol Multiphysics dedicat pentru analiza cu element finit, s-a realizat modelarea dispozitivului microfluidic pentru analiza leucocitelor dintr-o probă de sânge.

Pentru modelare, s-au folosit următoarele date de intrare [7]:

1. Intrare sânge cu debitul de 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ;
2. Intrare soluție de lizare cu debitul de 60  $\mu\text{l}/\text{min}$ ;

3. Intrare soluție de stopare a lizării, având debitul de 265 μl/min.

S-au determinat vitezele de intrare, prezentate în figura 6, cunoscându-se secțiunile circuitelor.

Etapele de modelare în Comsol Multiphysics sunt prezentate în continuare [7]:  
 Etapa 1. Alegerea modulului de calcul: Se alege spațiul dimensional 2D și curgerea laminară.

Viteza curgere	Vsange	0.0002	m/s	1.00	Raport viteze
	Vlizare	0.0024	m/s	12.00	
	Vstopizare	0.010600	m/s	53.00	

Fig. 6. Valorile vitezelor



Fig. 7. Alegerea modulului de calcul

Name	Expression	Value	Description
l1c	15000	15000.0	lungime chip
l2c	10000	10000.0	latime chip
a	300	300	latime canal
l6	1500	1500	lungime intrare sange
lin	100	100	lungime intrare s si l
l1	1000	1000	lungime canal 1 orizontal pentru constructie
vs	0.0002	2.0E-4	viteza intrare sange [m/s]
vl	vr*12	0.0024	viteza intrare lizare [m/s]
pout	101325	101300.0	presiune la iesire [Pa]
rac	300	300	raza racordare
l2	1500	1500	lungime canal 2 vertical
l3	1000	1000	lungime canal 3 vertical, la intrare stop lizare
l4	1500	1500	lungime canal 4 orizontal

Name	Expression	Value	Description
vl	vr*12	0.0106	viteza intrare stopare lizare [m/s]
l5	200	200	lungime iesire
b	15	15	latime segment numarare
l6	60	60	lungime segment numarare
l7cap	4002	4002	lungime camera de captare
l7cap	3052	3052	latime camera de captare
rp	178/2	89	raza piloni
distp	12	12	distanta intre piloni
rep	(l7cap-distp)/(distp-2*rp)	16	numarul de piloni pe axa x
rep	(l7cap-distp)/(distp-2*rp)	21	numarul de piloni pe axa y
l2	12	12	latime canal numarare 2
l1	30	30	lungime canal numarare 2

Fig. 8. Parametrii de modelare din 'Global definition'

Etapa 2. Parametrizarea modelului este exemplificată în figura 8, unde sunt evidențiate dimensiuni.

Etapa 3. Crearea geometriei: Luând în considerare faptul că majoritatea dimensiunilor sunt exprimate în μm, se adoptă dimensiunea generală a geometriei această unitate de măsură, cu evidențierea părților specifice ale dispozitivului microfluidic, conform fig. 9.

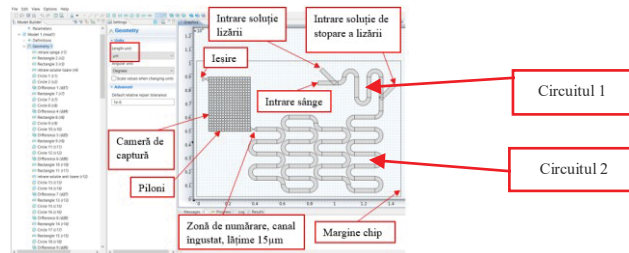


Fig. 9. Crearea geometriei dispozitivului microfluidic

Etapa 4. Alocarea materialului: Lichidele implicate în modelare se asimilează cu apa, care se află în proporția cea mai mare în compoziția acestora peste 99,7 %, care se va alocă geometriei (fig. 10):

Property	Na...	Value	Unit
✓ Dynamic viscosity	mu	eta(T[1/K])[Pa*s]	Pa*s
✓ Density	rho	rho(T[1/K])[kg/m^3]	kg/m^3

Fig. 10. Alocarea materialului

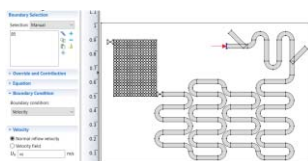
Etapa 5. Condiții la limită: Se utilizează modelul matematic conform ecuațiilor diferențiale (2) și (3), pe care le rezolvă modul de calcul adoptat:

$$\rho(\mathbf{u} \cdot \nabla)\mathbf{u} = \nabla \cdot \left[ -p\mathbf{I} + \mu(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T) - \frac{2}{3}\mu(\nabla \cdot \mathbf{u})\mathbf{I} \right] \quad (2)$$

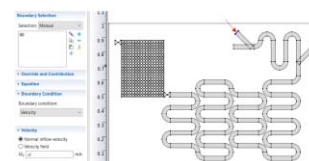
$$\nabla \cdot (\rho\mathbf{u}) = 0 \quad (3)$$

unde: u- viteza fluidului [m/s]; ρ- densitatea [kg/m<sup>3</sup>], μ- vâscozitatea dinamică [Pa\*s]; p- presiunea [Pa]; l- lungimea [m]; T- temperatura; variabilele μ și ρ sunt dependente de temperatură [9].

În figura 11 sunt prezentate condițiile la limită sub forma a trei intrări exprimate în viteze perpendiculare pe suprafața de intrare și o ieșire sub formă de presiune la ieșire.

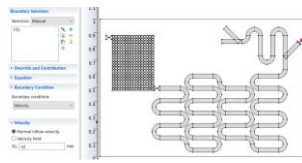


I. Intrare sânge [m/s];

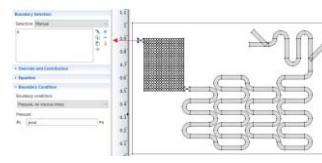


II. Intrare soluție de lizare [m/s];

Fig. 11.1. Condiții la limită



III. Intrare soluție de stopare a lizării [m/s];



IV. Ieșire, presiunea atmosferică [MPa].

Fig. 11.2. Condiții la limită

Etapa 6. Discretizarea: Se realizează cu elemente triunghiulare libere de tip fine (vezi figura 12).

Etapa 7. Rularea modelului și vizualizarea rezultatelor: S-au calculat în regim staționar vitezele de curgere și presiunile în fiecare punct al circuitului (vezi figura 13).

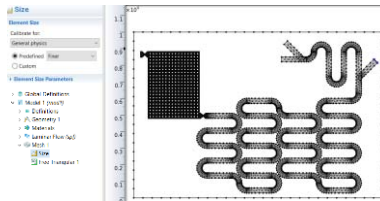


Fig. 12. Discretizarea circuitului de curgere a celor trei fluide

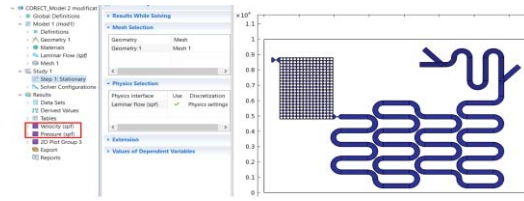


Fig. 13. Rularea modulului de calcul în regim staționar

#### 4. Rezultate

Dispozitivul este format din două circuite: primul circuit și al doilea circuit. Timpul de parcurgere ale celor două circuite trebuie să se încadreze în anumite intervale de timp: la primul, între 3 și 5 secunde pentru a se realiza o descompunere cât mai bună a eritrocitelor și a se evita lizarea leucocitelor; la doilea circuit, între 6 și 20 secunde pentru a se stopa efectul soluției de lizare și a nu produce și descompunerea limfocitelor [7].

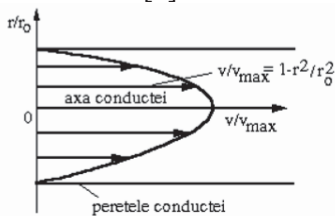


Fig. 14. Distribuția vitezei [9]

Conform figurii 14 se poate observa faptul că viteza la mișcarea laminară a fluidului într-un tub de curent are o distribuție parabolică. Datorită distribuției parabolice valoarea minimă a vitezei, chiar nulă, este pe peretele conductei, iar valoarea maximă a acesteia este pe axa longitudinală.

Au fost construite 10 variante de geometrie (vezi figurile 15-24) pentru care s-au calculat timpii de parcurgere a circuitelor și s-au comparat rezultatele obținute cu intervalele cerute, menționate anterior.

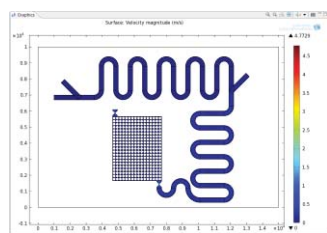


Fig. 15. Viteza în varianta inițială a geometriei

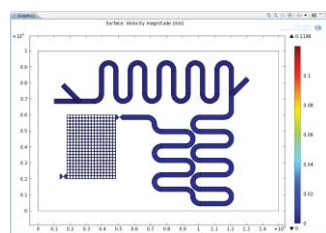


Fig. 16. Viteza în prima variantă modificată

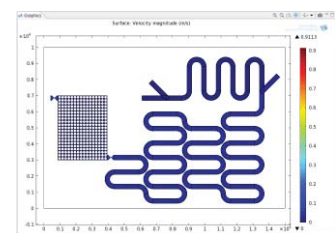


Fig. 17. Viteza în a doua variantă modificată

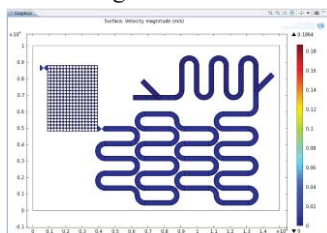


Fig. 18. Viteza în a treia variantă modificată

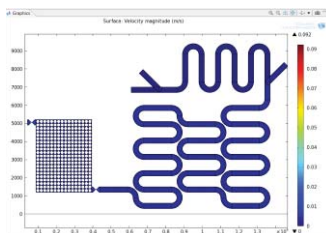


Fig. 19. Viteza în a patra variantă modificată

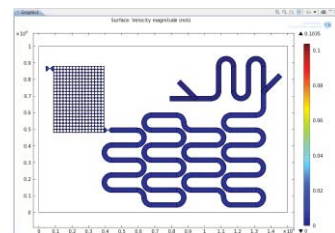


Fig. 20. Viteza în a cincea variantă modificată

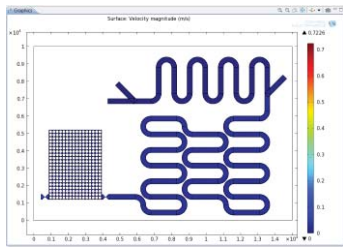


Fig. 21. Viteza în a șasea variantă modificată

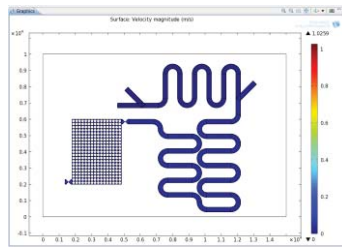


Fig. 22. Viteza în a șaptea variantă modificată

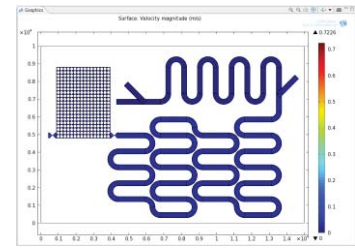


Fig. 23. Viteza în a opta variantă modificată

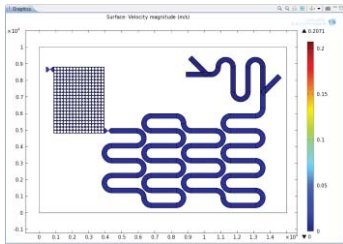


Fig. 24. Viteza în a noua variantă - finală

1.82E-03	viteza medie	m/s	
0.00135	3*12	m	3 segmente verticale
0.004239	3*3.14*(rrac+a/2)	m	3 arce de cerc
0	3.14*(rrac+a/2)/2	m	sfert de cerc
0.005589	lg circuit	m	lungimea totala
3.07E+00	timp	s	
1500	l2	um	
450	rrac+a/2	um	

Fig. 25. Timpul de parcurgere - primul circuit

0.00858144	viteza medie	m/s	
0.036	24*14	m	24 segmente orizontale
0.01413	20*(rrac+a/2)*pi/2	m	20 arce de cerc
0.0049455	7*pi*(rrac+a/2)/2	m	7 sferturi de cerc
0.001	l3	m	canal vertical
0.0560755	lg circuit 2	m	lungimea totala
6.53450908	timp	s	
450	rrac+a/2	um	
1500	l4	um	
1000	l3	um	

Fig. 26. Timpul de parcurgere - al doilea circuit

În varianta finală, pentru viteza de intrare a sângelui  $v_s = 0.0002$  m/s, s-au obținut următoarele valori ale timpului de parcurgere (conform figurilor 25 și 26):

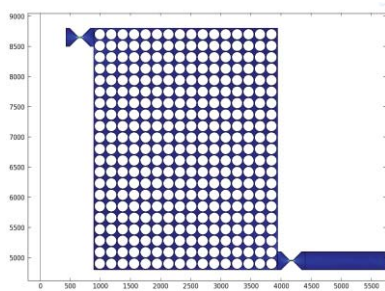


Fig. 27. Camera de captură cu piloni de reținere

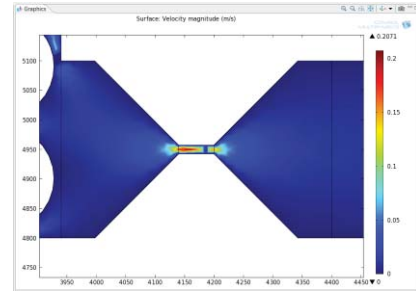


Fig. 28. Canal de numărare 1 a limfocitelor T

În figura 28 se poate observa faptul că viteza în canalul de numărare ( $v_2$ ), crește semnificativ față de restul circuitului ( $v_1$ ), odată cu reducerea secțiunii de la valoarea  $a$  la valoarea  $b$  (v. relația 4) [9]:

$$Q = a h v_1 = b h v_2 \quad (4)$$

unde:  $Q$ - debitul volumic;  $v_1, v_2$  – vitezele de curgere;  $a, b$  – dimensiunile transversale ale canalului de curgere;  $h$ - înălțimea circuitului.

Vizualizarea rezultatelor se face urmărind variația vitezei de curgere a fluidelor (figura 29) și a presiunii acestora (figura 30). Conform figurilor 31 și 32 se poate observa faptul că presiunea scade în momentul în care se ajunge în canalul de numărare datorită lungimii circuitului și schimbării de direcție de curgere.

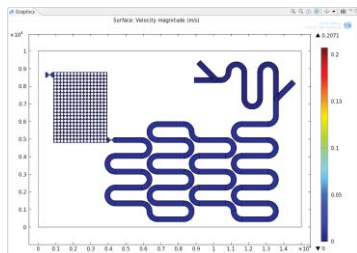


Fig. 29. Viteza în dispozitiv

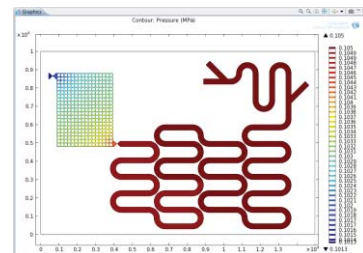


Fig. 30. Presiunea din dispozitiv

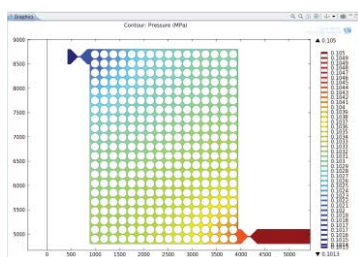


Fig. 31. Presiunea din camera de captură

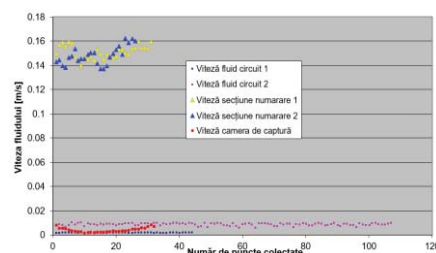


Fig. 32. Variația fluidului în puncte de pe traseu

Graficul de variație a vitezei fluidului este prezentat în figura 32. Se pot observa următoarele aspecte: viteza fluidului prin cele două circuite se menține relativ constantă; viteza în camera de captură are formă convexă; vitezele în cele două secțiuni de numărare au tendință crescătoare (vezi figura 28).

## 5. Concluzii

1. A fost modelat un dispozitiv microfluidic de tip lab-on-a-chip (MEMS), în vederea realizării practice pe o plăcuță de siliciu cu dimensiuni milimetrice, folosind microtehnologii fotochimice; dispozitivul este utilizat pentru determinarea numărului de limfocite T dintr-o probă de sânge.

2. Acest MEMS prezintă avantaje majore printre care: furnizează un rezultat rapid al acestei analize; utilizează un volum foarte redus al probei de sânge; oferă mai ales posibilitatea determinării numărului de limfocite pentru două tipuri diferite, ceea ce nu este posibil cu aparatura convențională de analize, fiind calibrat dimensional în acest scop în funcție de tipul de limfocite determinate.

3. Au fost construite iterativ 10 modele cu geometrii diferite și ajustate vitezele de alimentare cu lichide, realizabil practic cu ajutorul unor micropompe, păstrând raportul debitelor acestora, cu scopul de a obține timpi de parcurgere a probei de sânge mixată cu substanțele de lizare și antilizare a celor două circuite dedicate, în intervalele de timp prescrise, pentru ca substanțele folosite să își facă efectul.

4. Au fost vizualizate pe varianta finală, variațiile vitezei de curgere și ale presiunii, care demonstrează că lichidele mixate parcurg întregul circuit al dispozitivului microfluidic, permițând intrarea în canalul de numărare pentru determinarea analogică a numărului de limfocite T, apoi în camera de captură a acestora, eliberând numai limfocite cu dimensiuni mai mici spre a fi numărate într-un al doilea canal dedicat.

## 6. Bibliografie

- [1] Marinescu, R. și Ghiculescu, D. (2017), „Technological aspects regarding the use of photolithography in obtaining micro-electro-mechanical systems (MEMS)”, *Nonconventional Technologies Review*, Vol. XXI, Nr. 1, p. 24-29, ISSN 2359 – 8646.
- [2] Jingdong, C. și Di, C. (2013), „Progress of Microfluidics for Biology and Medicine”, *Nano-Micro Lett.* 5 (1), p. 66-80.
- [3] \*\*\* „DSA Re-Enters Litho Picture”, disponibil la: <https://semiengineering.com>, accesat la: 07.02.2020
- [4] \*\*\* „Un nou dispozitiv microfluidic poate detecta celulele canceroase din sange”, disponibil la: <https://www.medlife.ro/articole-medicale>, accesat la: 07.02.2020.
- [5] \*\*\* „Sânge” disponibil la <https://www.csid.ro>, accesat la: 11.02.2020.
- [6] BARTHES-BIESEL, EDWARDS-LEVY, 2009, „Conception et réalisation d’un système microfluidique pour la production de gouttes calibrées et leur encapsulation”
- [7] Ghiculescu D., Curs „Ingineria Asistată a Micro și Nanotehnologiilor”, disponibil la: <https://fiir.curs.pub.ro/2019/>, accesat la: 20.02.2020.
- [8] \*\*\* „Principiul lui Bernoulli”, 2018, disponibil la <https://www.setthings.com/ro/principiul-lui-bernoulli/>, accesat 25.03.2020
- [9] \*\*\* Popescu D., „Mecanica Fluidelor”, Universitatea din Craiova, Disponibil la: <http://retele.elth.ucv.ro/Popescu%20Daniela/Mecanica%20Fluidelor>, accesat la 02.05.2020