

Separacija fluida akustoforezom

Marčec, Dorotea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:629725>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dorotea Marčec
DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dorotea Marčec

SEPARACIJA FLUIDA AKUSTOFOREZOM

DIPLOMSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vladimir Dananić

Članovi ispitnog povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Vladimir Dananić

prof. dr. sc. Gordana Matijašić

izv. prof. dr. sc. Krunoslav Žižek

Zagreb, rujan 2021.

SAŽETAK

U ovom radu proučena i prezentirana je akustoforeza, metoda separacije čestica iz fluida. Akustoforeza je dio akustofluidike, odnosno skupa metoda u kojima se na fluidne sustave djeluje UZV valovima. Pregledom fizikalnih zakona ponašanja fluida na mikroskali i usporedbom s ponašanjem na makroskali prikazan je osnovni uvid u shvaćanje ovakvih sustava sa strane mehanike fluida, a potom i kako se isti ponašaju pod djelovanjem UZV valova. Prikazani su osnovni dizajni sustava za akustoforezu i njihovi sastavni dijelovi te neke smjernice prilikom njihovog odabira. Potom su proučena tri zasebna slučaja u kojima se akustoforeza eksperimentalno koristila za separaciju čestica, a to su određivanje hematokrita, koncentriranje bakterija u svrhu otkrivanja sepse te koncentriranje stanica raka.

Ključne riječi: akustofluidika, akustoforeza, fluidi, mikrosustav, separacija čestica, separacija krvnih stanica

SUMMARY

In this work, acoustophoresis, a method of separating particles from fluids, is studied and presented. Acoustophoresis is a part of acoustofluidics, set of methods in which US waves influence fluid systems. An overview of the physical laws of fluid behavior on the microscale and a comparison with the behavior on the macroscale provides a basic insight into understanding of such systems by fluid mechanics with addition of closer look at how they behave under the action of ultrasonic waves. Basic designs of acoustophoresis systems and their components are presented, as well as some guidelines for their selection. Three separate cases in which acoustophoresis was experimentally used to separate particles were then studied: hematocrit determination, bacterial concentration to detect sepsis, and cancer cell concentration.

Key words: acoustofluidics, acoustophoresis, fluids, microsystem, particle separation, blood cell separation

Zahvaljujem svojem mentoru izv. prof. dr. sc. Vladimiru Dananiću na uvijek optimističnom duhu i ukazanom povjerenju, podršci te svim savjetima tijekom izrade završnog i diplomskog rada.

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na uhu za slušanje i neograničenoj, glasnoj te nadasve motivirajućoj podršci tijekom izrade ovog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI UVOD	2
2.1. Fluidi	2
2.1.1. <i>Općenito o fluidima</i>	2
2.1.2 <i>Karakteristike fluida</i>	3
2.1.3 <i>Svojstva fluida</i>	5
2.1.4 <i>Tipovi fluida</i>	8
2.1.5 <i>Reološko ponašanje fluida</i>	12
2.1.6 <i>Osnovni hidrodinamički pojmovi</i>	14
2.1.7 <i>Mikrofluidika</i>	14
2.1.8 <i>Krv kao fluid</i>	18
2.2. Ultrazvuk	22
2.2.1 <i>Definicija i ponašanje ultrazvučnih valova</i>	22
2.2.2. <i>Piezoelektrični efekt</i>	24
2.3. Akustofluidika	26
2.3.1. <i>Reološko ponašanje fluida pri djelovanju UZV zračenja</i>	26
2.3.2. <i>Ultrazvučni utjecaj na sustav mikrofluidike</i>	32
2.3.3. <i>Utjecaj UZV zračenja na čestice u mikrosustavu</i>	37
2.4. Izrada uređaja za akustofluidiku	40
2.4.1 <i>Dizajn mikroreaktora</i>	40
2.4.2 <i>Izrada rezonatora</i>	42
2.4.3 <i>Biokompatibilnost uređaja</i>	45
2.5. Primjena akustoforeze	45
2.5.1 <i>Nedostaci</i>	46
3. PREGLEDNI DIO	47
3.1. Određivanje postotka koncentracije eritrocita u krvi	47
3.1.1 <i>Materijali</i>	47
3.1.2 <i>Dizajn sustava</i>	48
3.1.3 <i>Metoda</i>	49
3.2. Detekcija bakterija u krvi u svrhu ranog otkrivanja sepse	49
3.2.1 <i>Materijali</i>	49

3.2.2 Dizajn sustava	50
3.2.3 Metoda	51
3.3 Koncentriranje stanica tumora iz krvi.....	52
3.3.1 Materijali	53
3.3.2 Dizajn sustava	54
3.3.3 Metoda	55
4. REZULTATI I RASPRAVA	57
4.1 Rezultati određivanja hemokrita.....	57
4.2. Rezultati detekcije bakterija u svrhu ranog otkrivanja sepse	61
4.3. Rezultati koncentriranja stanica tumora iz krvi.....	65
5. ZAKLJUČAK	71
Popis kratica i simbola.....	72
Literatura.....	73
ŽIVOTOPIS	76

1. UVOD

Svijet trenutno broji 7,8 milijardi ljudi od kojih se samo desetero nalazi u orbiti dok ostali žive u prijateljski nastrojenoj atmosferi. Populacija koja raste 1,05 % godišnje i većinski živi u gradovima zahtijeva konstantan napredak u znanosti i tehnologiji, a koji im omogućuje sigurniji i ugodniji život.

Tehnološki su napredci zaslužni za konstantni dovod čiste, pitke vode, odvod i obradu otpadnih voda te trgovine koje vrve različitim proizvodima u svako doba godine. Sve promjene koje je civilizacija doživjela preokrenule su navike ljudi i uvjete u kojima žive, stoga današnji čovjek živi značajnije duže nego njegovi preci. Međutim, promjena u načinu života, konzumacija različitih proizvoda proizvedenih s mnogim dodacima, onečišćen zrak, stres te društvene norme uzrokovali su mnoge medicinske probleme današnjim ljudima. Stoga je područje medicine i biotehnoške znanosti u stalnoj potrazi za novim lijekovima, dodacima prehrani, analizama i dijagnostičkim postupcima. Prema podacima WHO-a (*eng. World Health Organization*) više od 14 milijuna ljudi svake godine oboli od karcinoma, od kojih 8,8 milijuna umre od iste bolesti¹. S druge strane, u 2017. godini zabilježeno je 48,9 milijuna slučajeva sepse od kojih je 11 milijuna završilo tragično². Naravno, raspodjela bogatstva i životnih uvjeta značajno se razlikuje na različitim područjima država i svijeta pa je tako najveći broj smrtnih slučajeva zabilježen u slabo razvijenim zemljama koje nemaju adekvatnu zdravstvenu skrb ili razvijenim zemljama čiji stanovnici nemaju ravnopravni pristup zdravstvenoj skrbi. Stoga se mnogo truda ulaže u medicinske pomake koji bi omogućili lakšu i jeftiniju dijagnostiku. Jedna od takvih mogućnosti leži u akustoforezi, metodi akustične separacije kojom se mogu separirati krvne stanice, bakterije ili tumorske stanice iz krvi. Akustoforeza je u začecima razvoja i primjene u realnom sektoru jer je njeno proučavanje još uvelike vezano za laboratorije, ali daljnjim istraživanjima i tehnološkim napretcima ima potencijal postati jedna od metoda za dijagnostiku krvi, detektiranje sepse i proučavanje tumora u ljudi, kao što će se u ovom radu vidjeti.

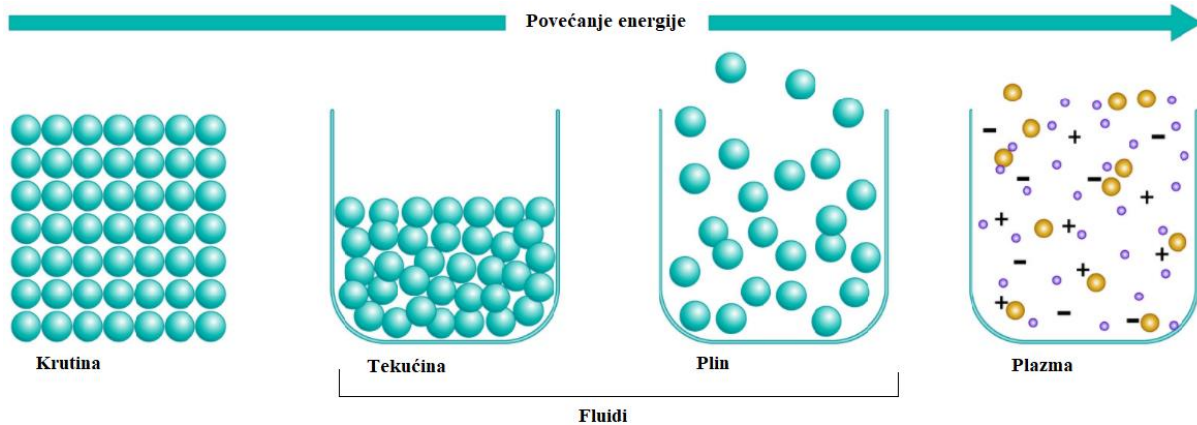
U skladu s tim, u ovom će se radu proučiti osnove fluidike na mikro i makro skali kako bi se adekvatno prikazalo ponašanje krvi kao fluida, utjecaja UZV zračenja na čestice i način na koji se čestice u krvi ponašaju u procesu akustoforeze te sagledati tri primjera gdje se akustoforeza eksperimentalno proučavala.

2. TEORIJSKI UVOD

2.1. Fluidi

2.1.1. Općenito o fluidima

Materija koja nas okružuje u svakodnevnom svijetu može se opisati agregatnim stanjem. Razlikujemo četiri agregatna stanja, a to su krutine, tekućine, plinove te plazmu (Slika 1.).



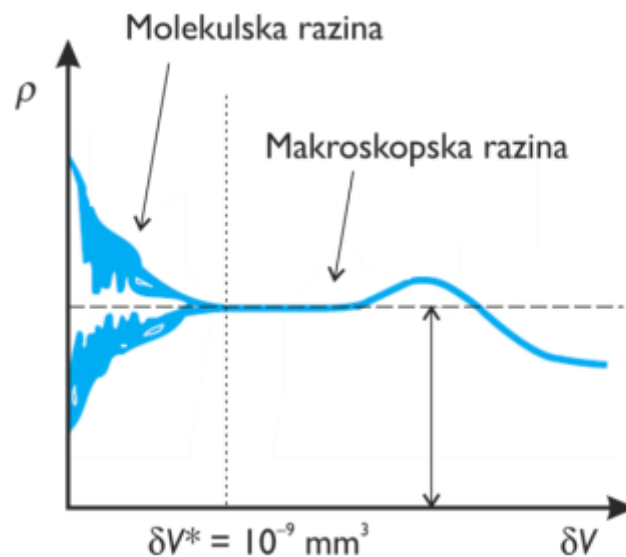
Slika 1. Prikaz agregatnih stanja materije i promjene energije u korespondenciji s promjenom agregatnih stanja³

Krutine su tvari vrlo pravilnog rasporeda molekula koje se deformiraju uslijed smičnog naprežanja⁴. Mogu biti sastavljene od atoma ili molekula i prema tome ih međusobno vežu snažne interatomske ili intermolekulske veze, a u kojima atomi, odnosno molekule, imaju najmanju količinu energije. Porastom energije dolazi do prijelaza iz krutog agregatnog stanja u tekuće, odnosno daljnjim porastom do prijelaza u plinovito agregatno stanje. Međumolekulske sile u tekućinama slabije su od onih u krutinama dok su u plinovitom stanju najmanje. Posljedica povećanja energije i smanjenja međumolekulskih sila vidljiva je u ponašanju tekućina i plinova gdje tekućine zauzimaju oblik posude u kojoj se nalaze dok plinovi ispunjavaju volumen cijele posude⁵. Fluid možemo opisati kao tvar koja se deformira pod djelovanjem najmanjeg smičnog naprežanja⁴. Primarno, fluidom smatramo tvari koje su tekuće ili plinovite, međutim postoji i izuzetak gdje se krutine ponašaju kao fluidi, a to je u obliku finog praha. Jedan je od takvih primjera tlo u Japanu koje je sačinjeno od finog pepela nastalog od mnogobrojnih vulkana koji se prilikom potresa ponašaju kao fluidi zbog vibracija koje na njih djeluju⁶.

2.1.2 Karakteristike fluida

Kontinuum i naprezanja

Mehanika fluida, koja proučava ponašanje fluida, ogranak je kontinuirane mehanike u kojoj se promatran sustav gleda kao kontinuirana masa ili volumen, a ne kao pojedinačne čestice⁷. Temelj proučavanja fluida bazira se na promatranju fluida kao kontinuuma čija su svojstva konstantne funkcije vremena i prostora. Svojstva fluida nisu konstantna po čitavom volumenu, stoga se na tu problematiku može gledati ovisno o tome radi li se o malom volumenu kada je potrebno definirati elementarni volumen fluida, odnosno δV , ili o velikom volumenu kada se svojstva definiraju po srednjoj vrijednosti što se naziva kontinuum. Ako se radi o malom volumenu fluida i definira se elementarni volumen, onda se sustav promatra na molekulskoj razini što znači da već i mala promjena u sustavu značajno mijenja njegova svojstva. S druge strane, kada se radi o velikom volumenu govori se o makroskopskoj skali na kojoj su male promjene gotovo neznčajne⁴. Slikovito objašnjenje može se vidjeti na Slici 2. koja pokazuje ovisnost gustoće o elementarnom volumenu nekog fluida za kojeg je definirana granična vrijednost volumena ispod koje se fluid promatra na mikroskopskoj skali, a iznad kojeg vrijedi makroskopska skala.



Slika 2. Prikaz ovisnosti gustoće fluida o elementarnom volumenu fluida⁴

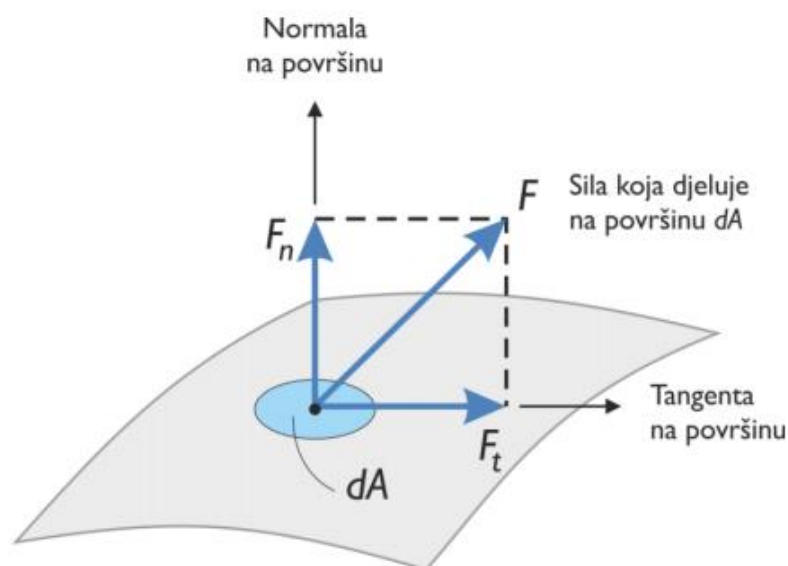
Kriterij kontinuuma se definira Knudsovim brojem, Kn

$$Kn = \frac{\lambda}{L} \quad (1)$$

gdje je λ srednji slobodni put molekule, a L je karakteristična dimenzija sustava⁴.

Srednji slobodni put molekule definiran je kao prosječna udaljenost koju u sustavu prijeđe pojedina čestica između dva sudara. Za plinove to je relativno velika brojka, međutim za fluide u tekućem obliku taj je broj približno jednak promjeru čestica⁸. Većina inženjerskih grana i industrija bavi se velikom količinom fluida za koje se može početi od pretpostavke da se ponašaju kao kontinuum. Fluidi u plinovitom stanju gledaju se kao kontinuum pri čemu se uz pomoć Knudsenovog broja može definirati par vrsta režima strujanja. Za vrijednost $Kn \leq 10^{-3}$ fluid se smatra kontinuumom, kada je vrijednost $10^{-3} \leq Kn \leq 10^{-1}$ režim strujanja još se uvijek može računati Navier-Stokesovom jednačbom. U tom se slučaju u obzir mora uzeti stvaranje gradijenta brzine s najmanjom brzinom fluida na stijenci dok se za vrijednosti veće od 10^{-1} u obzir mora uzeti i Boltzmannova jednačba kako bi se ispravno prikazao režim strujanja⁸. Međutim, kada se govori o mikrofluidici suspenzija, to je veoma teško tvrditi bez eksperimentalne provjere jer se fluide ponašaju značajno drukčije nego u makrosustavima. Razlog tomu je da je relativna veličina čestica u fluidu može biti usporediva sa samom veličinom kanala, stoga se u obzir mora uzeti dinamičko ponašanje čestica i njen utjecaj na ponašanje fluida za individualni promatrani sustav⁹.

Nakon osnovne usporedbe fluida u makrosustavima i mikrosustavima valjda se dotaknuti temelja što tvar čini fluidom, a to je deformacije pod bilo kojim naprežanjem. Naprežanje u fluidima može biti normalno naprežanje i smično naprežanje (Slika 3.).



Slika 3. Prikaz naprežanja koja djeluju na fluid⁴

Normalno je naprezanje djelovanje sile okomito na fluid, jednoliko po cijelom poprečnom presjeku. Normalno naprezanje, σ , definira se:

$$\sigma = \frac{F_n}{dA} \quad (2)$$

gdje je F_n sila (N) koja djeluje okomito na površinu fluida dA (m^2).

Kada je fluid u mirovanju, normalno naprezanje koje na njega djeluje naziva se tlak.

Smično naprezanje rezultat je djelovanja tangencijalne sile na površinu poprečnog presjeka fluida. Smično naprezanje, τ , definira se:

$$\tau = \frac{F_t}{dA} \quad (3)$$

gdje je F_t tangencijalna sila (N) koja djeluje na površinu fluida dA (m^2).

2.1.3 Svojstva fluida

Svaki fluid, neovisno o tome na kakvoj se skali odvija njegovo strujanje, karakterizira se skupom svojstava koja utječu na njegovo ponašanje i samim time na granice njegove upotrebe.

Gustoća fluida

Gustoća predstavlja masu fluida u jediničnom volumenu. Fluidi u plinovitom obliku mijenjaju se ovisno o tlaku i temperaturi, a u najjednostavnijem se slučaju njihova gustoća računa izvođenjem iz jednadžbe idealnog plina:

$$\rho = \frac{p \cdot m}{R \cdot T} \quad (4)$$

gdje je ρ gustoća (kg/m^3), p tlak (Pa), m masa plina (kg), R opća plinska konstanta (8,314 J/molK) i T temperatura (K).

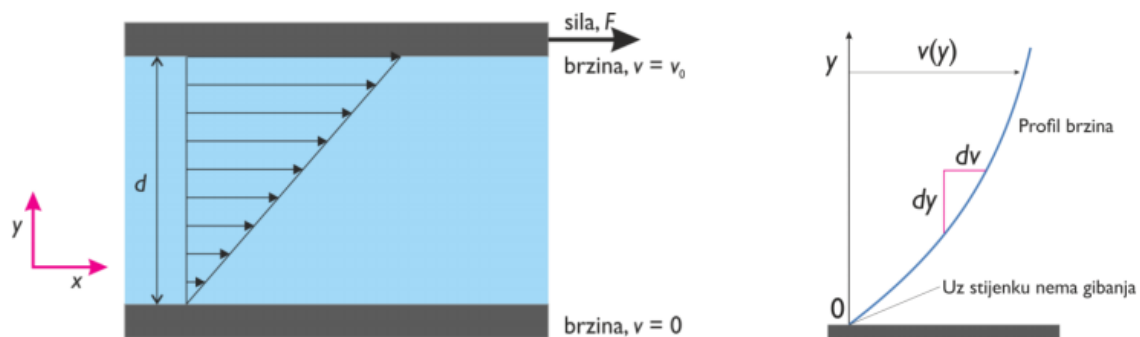
S druge strane, tekućinama je gustoća konstantna jer ih se smatra nestlačivim tako da se ona mora eksperimentalno odrediti pri čemu je njezina vrijednost konstantna u izotermnim uvjetima⁴.

Viskoznost

Viskoznost je mjera unutarnjeg otpora fluida smičnom naprezanju, odnosno smičnoj deformaciji. Unutar fluida može se definirati sila otpora, odnosno sila koja djeluje na tijelo u smjeru gibanja pri čemu vrijedi da povećanjem viskoznosti raste i sila otpora⁴.

Koncept viskoznosti prvi je spomenuo Newton kada je pokušavao objasniti privremeno brže gibanje Zemlje kada bi u rotacijama oko Sunca Zemlja i Venera bile najbliže. Newton je taj fenomen pridodavao sili otpora u planetarnom fluidu ili eteru koji ispunjava svemir⁶. Naravno, danas je poznato kako ne postoji planetarni fluid, već je svemir vakuumski prostor, ali zahvaljujući Newtonovim eksperimentima s tekućinama i pločama Newtonov zakon viskoznosti koji je bilo produkt njegovog istraživanja i danas se koristi u fluidici.

Jednostavan prikaz Newtonovog zakona viskoznosti vidljiv je na Slici 4. gdje je promatrano gibanje fluida koji se nalazi između dvije ravne ploče od kojih donja miruje, a gornja se giba konstantnom brzinom, v .



Slika 4. Prikaz gibanja fluida i profila brzina kada se fluid giba između dvije ploče⁴

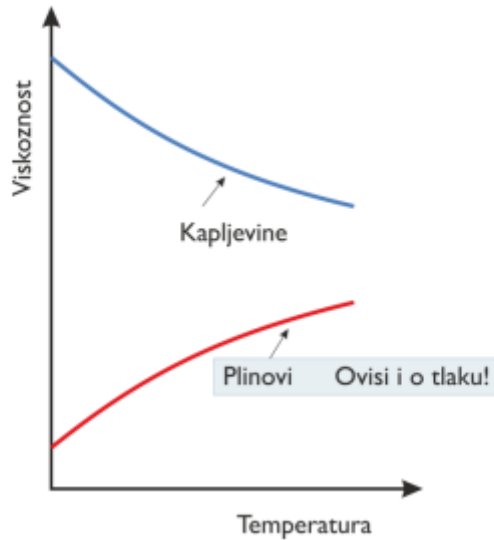
Viskoznost fluida, odnosno otpor fluida smičnom naprezanju, uzrokovat će pojavu gradijenta brzine, $\frac{dv}{dy}$. Gradijent brzine može se objasniti u obliku zamišljenih slojeva fluida, po poprečnom presjeku, od kojih svaki ima svoju brzinu, a generalno predstavlja smičnu brzinu^{4,10}.

Newtonov zakon viskoznosti se može zapisati:

$$\tau = \eta \cdot \left(\frac{-dv}{dy} \right) \quad (5)$$

gdje je τ smično naprezanje (Pa), η dinamička viskoznost i $\frac{dv}{dy}$ je gradijent brzine (s^{-1})¹⁰.

Općenito se s povišenjem temperature viskoznost kapljevine smanjuje, a viskoznost plinova se povećava, kako je to ilustrirano na Slici 5.



Slika 5. Promjena viskoznosti kapljevine i plinova s temperaturom⁴

Osim dinamičke viskoznosti izražene Newtonovim zakonom, definirati se može i kinematička viskoznost, ν :

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (6)$$

gdje je η dinamička viskoznost (kg/ms), a ρ je gustoća fluida (kg/m³)¹⁰.

Stlačivost i akustična brzina

U tekstu se već navelo kako su tekućine nestlačive u usporedbi s plinovima, što je točno, ali one ipak jesu stlačive do neke male granice pa je tako elastičnost vode 0,012 puta one zraka. Stlačivost je ovisna o temperaturi dok tlak ima malo utjecaja na nju, a izražava se uz pomoć skupnih modula. Za neke tekućine, poput vode, podaci o stlačivosti pri različitim uvjetima temperature i tlaka vrlo se lako nađu dok za mnoge druge ti podaci nisu lako dostupni pa se često aproksimiraju preko stlačivosti vode¹⁰.

Stlačivost je od velike važnosti za promatranje fluida pod utjecajem akustičnih valova jer su akustični valovi i skupni moduli stlačivosti u direktnoj poveznici¹⁰. U određenim uvjetima akustična rezonancija može stvoriti idealne uvjete za kavitaciju što je pogubno za određene industrijske procese, ali i za kontrolu i separaciju fluida pod utjecajem UZV valova. U Tablici 1. prikazana su elastična svojstva nekih tekućina.

Tablica 1.. Elastična svojstva nekih tekuća pri 0,1 MPa i 25°C¹⁰

Tekućina	Modul stlačivosti N/m ²	Brzina širenja vala m/s	Procijenjena brzina širenja vala u cijevi m/s	
			Steel	PVC
Aceton	$0.8 \cdot 10^9$	1000	850	280
Benzin	$1.0 \cdot 10^9$	1170	1000	320
Etilen-glikol	$2.7 \cdot 10^9$	1560	1150	300
Glicerol	$4.5 \cdot 10^9$	1890	1400	380
Kloroform	$1.0 \cdot 10^9$	820	700	230
Živa	$24 \cdot 10^9$	1330	430	-
Metanol	$0.8 \cdot 10^9$	1000	850	280
Ulje	$1.5 \cdot 10^9$	1300	1000	300
Terpentin	$1.4 \cdot 10^9$	1270	1000	300
Destilirana voda	$2.2 \cdot 10^9$	1480	1100	300
Morska voda	$2.4 \cdot 10^9$	1530	1100	300

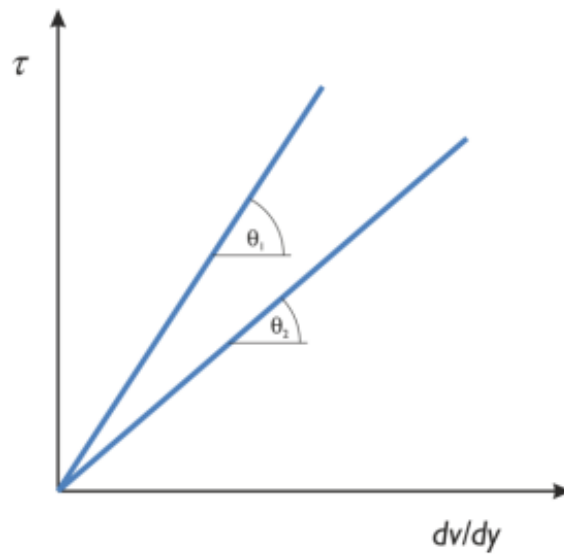
2.1.4 Tipovi fluida

Fluide možemo podijeliti prema odnosu smičnog naprežanja, η , i gradijenta smične brzine, $\frac{dv}{dy}$.

Na temelju tog odnosa kapljevine se dijele na Newtonove i ne-Newtonove kapljevine.

Newtonove kapljevine

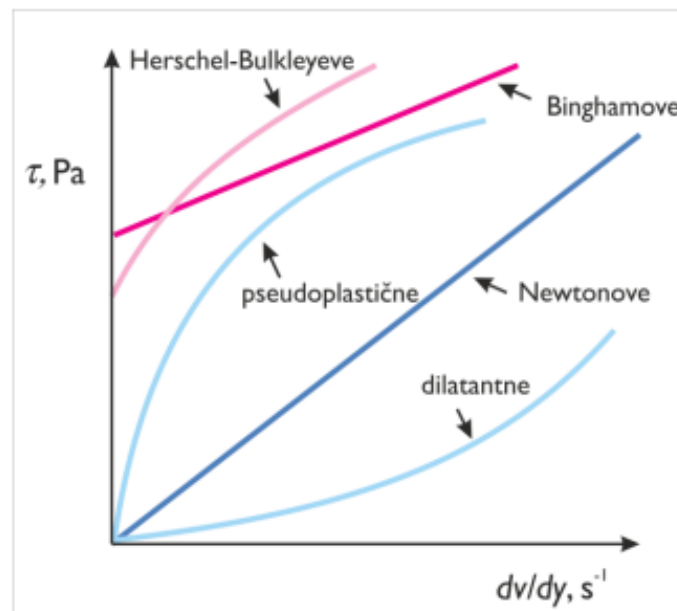
Ime ovih kapljevine da naslutiti kako će se one ponašati sukladno Newtonovom zakonu viskoznosti. Smično naprežanje ovih kapljevine proporcionalno je gradijentu brzine smicanja, odnosno viskoznost ostaje konstanta bez obzira na promjenu brzine smicanja, što je vidljivo na Slici 6¹⁰.



Slika 6. Reološki dijagram Newtonovih kapljevine⁴

Ne-Newtonove kapljevine

Ne-Newtonove kapljevine mogu biti pseudoplastične, dilatantne i viskoplastične kapljevine. Ostwald de Waelove kapljevine mogu biti pseudoplastične ili dilatantne dok su one viskoplastične definirane Herschel-Bulkleyevim ili Binghamovim ponašanjem⁴. Reološki dijagram koji uspoređuje Newtonove i ne-Newtonove kapljevine dan je Slikom 7.

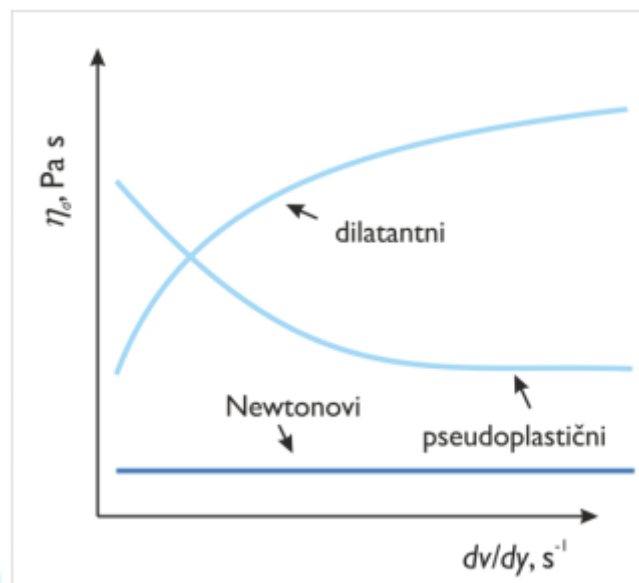


Slika 7. Reološki dijagram kapljevine⁴

Ostwald de Waelove kapljevine mogu se opisati reološkim modelom:

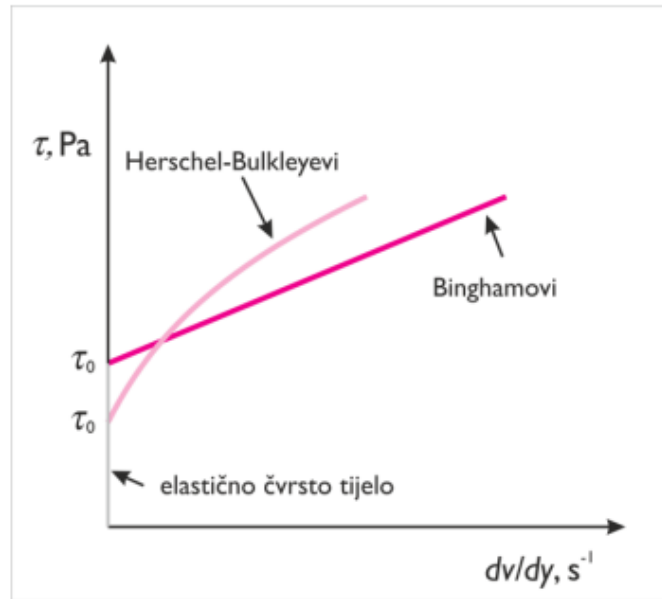
$$\tau = K \cdot \left(\frac{-dv}{dy} \right) = K \cdot \gamma^n \quad (7)$$

gdje je K koeficijent konzistencije (Pas^n), n indeks ponašanja toka, a γ je smična brzina (s^{-1}). Ako je indeks ponašanja toka, n , veći od jedan, kapljevine su dilatantne, a ako je manji od jedan onda su pseudoplastične. Za ovakve kapljevine se kaže kako imaju prividnu viskoznost što je ustvari nagib tangente povučene na reološku krivulju u određenoj točki smične brzine. Prividna viskoznost dilatantnih kapljevina raste porastom smične brzine dok se ona pseudoplastičnih smanjuje što je vidljivo na Slici 8⁴.



Slika 8. Promjena prividne viskoznosti s promjenom smične brzine⁴

Kapljevine koje se ponašaju kao elastično čvrsto tijelo, a koje počinju teći kada su izložene dovoljno velikom smičnom naprezanju, nazivaju se viskoelastičnim kapljevina. Minimalno smično naprezanje koje uzrokuje tečenje viskoelastične kapljevine naziva se granica tečenja, τ_0 . Ponašanje viskoelastičnih kapljevina opisuje se Herschel-Bulkleyevim ili Binghamovim modelom, a nakon što kapljevina počne teći ponašanje je istovjetno onom Newtonovih ili Ostwald de Waelovih kapljevina⁴. Reološki prikaz ponašanja viskoelastičnih kapljevina vidljiv je na Slici 9.



Slika 9. Reološki dijagram viskoelastičnih kapljevine⁴

Nakon postizanja granice tečenja, Binghamove kapljevine imaju linearnu ovisnost smičnog naprezanja o gradijentu smične brzine dok se Herschel-Bulkleyeve kapljevine ponašaju kao pseudoplastične ili dilatantne kapljevine.

Za Binghamove kapljevine vrijedi:

$$\tau = \tau_0 + \eta_p + \gamma \quad (8)$$

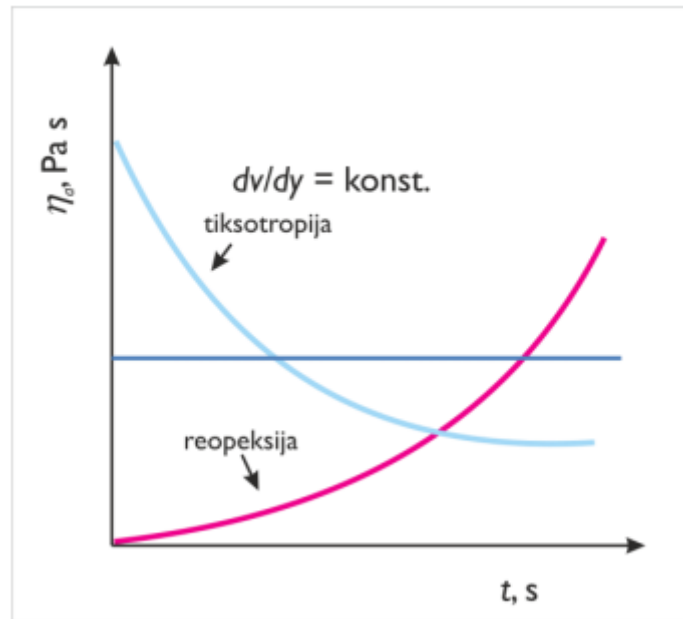
gdje je τ smično naprezanje (Pa), τ_0 granica tečenja (Pa), η_p plastična viskoznost (Pas).

Dok za Herschel-Bulkleyeve kapljevine vrijedi:

$$\tau = \tau_0 + K_{HB} + \gamma^n \quad (9)$$

gdje je τ smično naprezanje (Pa), τ_0 granica tečenja (Pa), K_{HB} koeficijent konzistencije (Pasⁿ; n- indeks ponašanja toka), a γ je smična brzina (s⁻¹)⁴.

Navedene ne-Newtonove kapljevine vremenski su neovisne, odnosno njihova viskoznost ne ovisi o vremenu trajanja nekog procesa u kojem sudjeluju. Postoje i vremenski ovisne kapljevine koje su opisane tiksotropnim, reopeksnim i strukturnim modelima koji se mogu vidjeti na Slici 10¹⁰.



Slika 10. Prikaz vremenski ovisnih ne-Newtonovih kapljevina⁴

Ovdje se spominju dvije pojave koje se povezuju s promjenom viskoznosti u vremenu, a to su tiksotropija i reopeksija. Reopeksija obilježava povećanje viskoznosti kapljevine s vremenom dok je tiksotropija smanjenje viskoznosti s vremenom. Do smanjenja viskoznosti s vremenom najčešće dolazi zbog narušavanja strukture kapljevine i što često kao posljedicu ima manju viskoznost nakon povratka na početnu smičnu brzinu⁴.

2.1.5 Reološko ponašanje fluida

Generalno, strujanje se može podijeliti prema mnogim parametrima, ali u ovom radu spomenut će se najvažnije za daljnje objašnjenje promatranog fenomena.

Laminarno i turbulentno strujanje

Laminarno strujanje karakteristično je gibanje fluida pri malim brzinama kod kojeg dolazi do strujanja u slojevima. Takvo strujanje uzrokovano je velikom viskoznošću fluida pri čemu se stvara trenje između slojeva fluida, ali i fluida i stijenke cijevi što posljedično daje različitu brzinu slojeva fluida koji se međusobno ne miješaju¹¹.

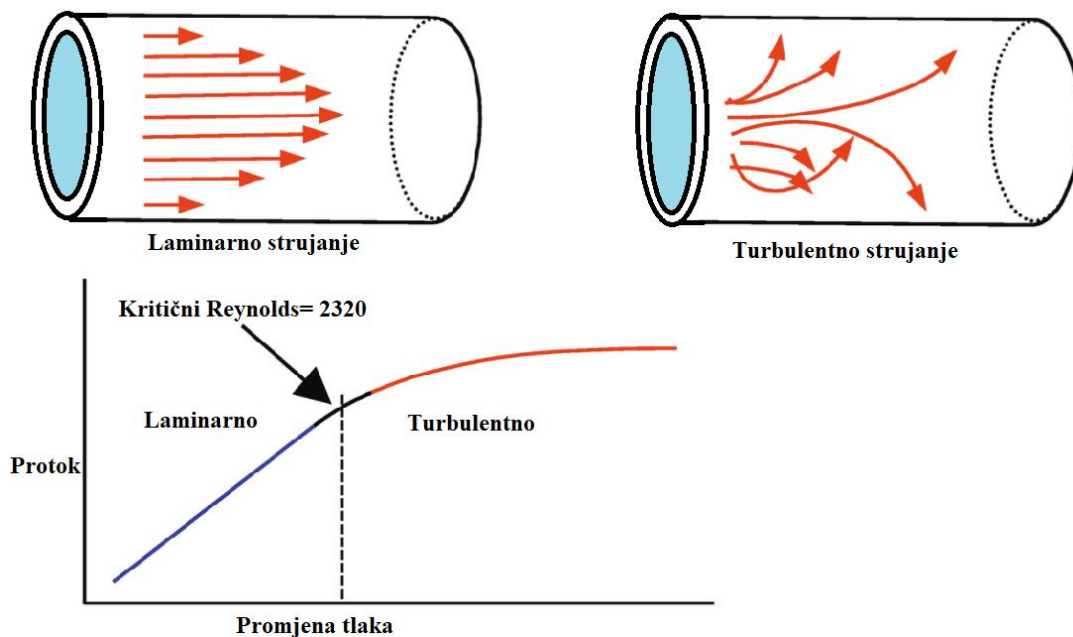
Turbulentno je strujanje karakteristično za velike brzine strujanja niskoviskoznih fluida. Ono se još naziva i vrtložno strujanje jer dolazi do pojave vrtloženja i potpunog miješanja slojeva fluida¹¹.

Reynoldsovom značajkom određuju se hidrodinamički uvjeti sustava:

$$Re = \frac{v \cdot d \cdot \rho}{\eta} \quad (10)$$

gdje je v brzina strujanja fluida (ms^{-1}), d je promjer cijevi (m), ρ je gustoća fluida (kg/m^3) i η je dinamička viskoznost fluida (Pas).

Reynoldsova je značajka bezdimenzijska, a eksperimentalno je određena kritična vrijednost Reynoldsove značajke koja predstavlja granicu između laminarnog i prijelaznog režima strujanja fluida i ona iznosi 2320¹¹. Slikoviti je prikaz vidljiv na Slici 11.



Slika 11. Prikaz laminarnog i turbulentnog strujanja¹²

Stacionarno i nestacionarno strujanje

Stacionarno strujanje fluida smatra se onim gdje je parcijalna derivacija brzine fluida po vremenu nula, ($\frac{dv}{dt} = 0$), odnosno da na određenom mjestu brzina fluida ne ovisi o vremenu, već samo o prostoru. Kod stacionarnog strujanja čestica u fluidu može imati ubrzanje koje nastaje zbog razlike brzine između dva bliska mjesta. Nestacionarno je strujanje ono kod kojeg brzina strujanja ovisi o vremenu ($\frac{dv}{dt} \neq 0$) i prostoru. Fluidna čestica ima komponentu ubrzanja koja nije posljedica razlika brzina između dva bliska mjesta¹¹.

2.1.6 Osnovni hidrodinamički pojmovi

Nakon kratkog uvoda u kojem su se definirali fluidi, ukratko se objasnila njihova podjela i karakteristike te spomenula strujanja koja su od važnosti za ovaj rad, valja spomenuti i definirati neke osnovne pojmove te veličine koji se koriste u definiranju hidrodinamičkih režima.

Do sada su spomenuta dva pojma koja su od velike važnosti, a to su viskoznost i Reynoldsov broj. Ono što je potrebno definirati je gustoća toka ili fluks:

$$\Phi = K \cdot \frac{\Delta}{y} \quad (11)$$

gdje je Φ fluks, K je koeficijent prijenosa koji predstavlja fizička svojstva tvari, Δ pokretačka sila, a y je udaljenost između točaka između kojih se odvija prijenos¹¹. Spomenuta pokretačka sila procesa razlog je zašto do nekog procesa dolazi. Ako se promatra prijenos topline, poznato je kako toplina spontano prelazi s toplijeg tijela na hladnije tijelo i u tom slučaju pokretačka je sila razlika u temperaturi.

Osnovni fizikalni zakoni očuvanja energije i gibanja vrijede uvijek i svugdje pa tako i ovdje stoga se valja osvrnuti na njih. Od posebnog je interesa zakon očuvanja energije koji nalaže kako je zbroj svih vrsta mehaničke energije stalan u nekom zatvorenom sustavu. U realnom je sustavu poznato da, iako je zbroj energije stalan, dio energije se gubi iz samog promatranog sustava u obliku nepovratnog gubitka energije. U hidrodinamici taj gubitak energije očituje se u padu tlaka u sustavu. Pad tlaka u promatranom sustavu ovisi o hidrodinamičkom režimu, stoga je pad tlaka pri laminarnom strujanju u horizontalnoj cijevi definiran Hagen-Poiseuilleovom jednačinom:

$$\Delta p = \frac{32 \cdot \eta \cdot l \cdot v_{sr}}{d^2} \quad (12)$$

gdje je Δp pad tlaka, η je dinamička viskoznost fluida (Pas), l je duljina cijevi (m), v_{sr} je srednja brzina strujanja i d je promjer cijevi¹¹.

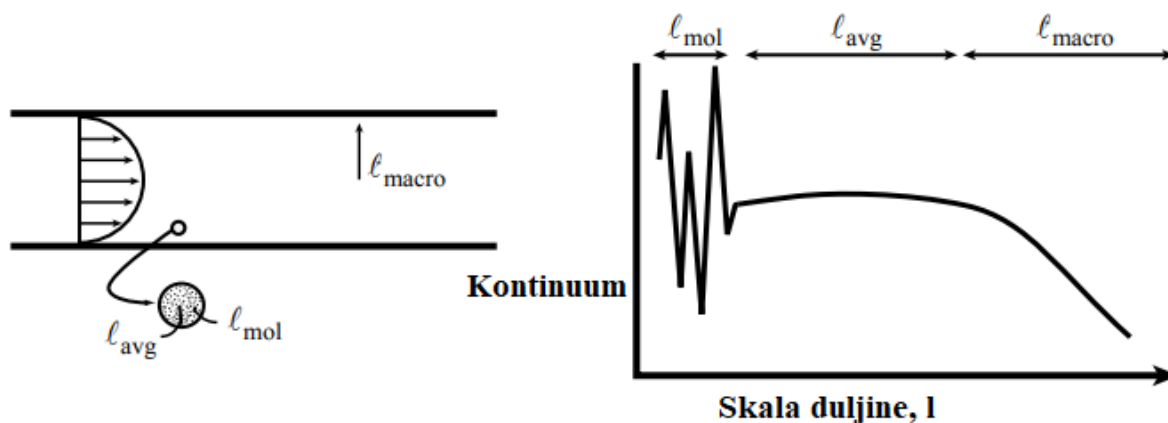
Pad tlaka pri turbulentnom strujanju vrlo je kompliciran, stoga se za procjenu njegove vrijednosti poseže za bezdimenzijskim veličinama i dimenzijskoj analizi.

2.1.7 Mikrofluidika

Sve dosad spomenute pojave, ponašanja fluida, karakteristike fluida, tipove strujanja i varijable koje su objašnjene valja spustiti na mikro razinu.

Naravno, kako to biva i u makrosustavima, najbitnija su svojstva fluida u mikrosustavu gustoća i viskoznost. U mikrosustavima, zbog malih dimenzija, utjecaj gravitacijske sile i hidrostatski tlak su zanemarivi¹³.

Prethodno u tekstu navedeno je kako pojam kontinuuma vrijedi i na mikroskali do vrijednosti Knudsenovog broja 0,3, međutim u ovom će se poglavlju to dodatno obrazložiti. Razlog zašto se pojam kontinuuma ne mora napustiti na maloj skali je zato što su molekule ipak dovoljno male u usporedbi s dimenzijama kanala da u promatrani volumen stane dovoljno molekula kako bi se računalno moglo odrediti neko svojstvo fluida. Ako se promatra voda u mikrokanalu, onda se slučaj može opisati na sljedeći način: molekula vode velika je svega nekoliko angstroma što znači da 5 molekula ima duljinu manju od 2 nm. Uzevši u obzir da su duljine mikrokanala znatno dulje od navedene duljine, dolazimo do zaključka kako je pojam kontinuuma i dalje primjenjiv¹³. Prikaz na Slici 12.



Slika 12. Opis kontinuuma na različitoj skali duljine u strujanju. L_{mol} predstavlja molekularnu i intermolekularnu dimenziju, l_{avg} duljinu koju uređaji za mjerenje koriste prilikom lokalnih mjerenja u sustavu i l_{macro} što je duljina s koje su mjerene varijacije¹³

Gibanje viskoznih Newtonovih fluida opisuje se Navier-Stokesovom jednačbom za nestlačivi fluid:

$$\rho \cdot \left(\frac{\partial u}{\partial t} + u \cdot \nabla u \right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 u + f_b \quad (13)$$

gdje je ρ je gustoća fluida (kg/m^3), u je vektor brzine (m/s), p je tlak (Pa), η je dinamička viskoznost fluida (Pas), a f_b predstavlja silu koja djeluje na fluid zbog gravitacije.

Lijeva strana ove jednačbe odnosi se na produkt mase i akceleracije kada fluid struji. Konvekcijski član, $u \times \nabla u$, može se smatrati jednakim nuli kada fluid teče u jednostavnoj

geometriji i pri malim protocima, što je značajno jer uklanja najkompliciraniji dio Navier-Stokesove jednadžbe. Desna strana pak objedinjuje sve sile koje djeluju na fluid, među kojima je i sila koja djeluje na fluid uslijed gravitacije za koju je već navedeno kako je zanemariva zbog malih dimenzija. Komponenta na koju treba obratiti pozornost u mikrosustavima je temperatura jer ona uvelike može utjecati na dinamičku viskoznost, η , što može utjecati na profil brzina. Navier-Stokesova jednadžba svjetski je poznata kao jednadžba bez jedinstvenog rješenja, stoga se za njeno rješavanje moraju odrediti granični uvjeti¹³.

Fluidi u mikrosustavu imaju svoj hidrodinamički režim, stoga, baš kao i u makrosustavima, njega određuje Reynoldsova značajka, \mathfrak{R} . Očekivano, Reynoldsova značajka u mikrosustavima značajno je manja nego u makrosustavima. Primjerice, ako se promatra voda koja teče u mikrokanalu visine 100 μm brzinom od 1 cm/s, tada će Reynoldsova značajka biti otprilike 0,1. U mikrofluidici duljine kanala značajno su veće od njihovih visina ili promjera te, ako tijekom protjecanja fluida dođe do promjene u visini/promjeru, dolazi i do fluktuacije brzine. Zbog toga se u mikrofluidici često može naići na vrijednost Re_{eff} , odnosno efektivnu Reynoldsovu značajku koja je definirana:

$$Re_{eff} = Re \cdot \frac{h}{l} \quad (14)$$

gdje je h visina kanala (m), l je duljina kanala (m).

Kada je Reynoldsova značajka mala, Navier-Stokesova jednadžba se pojednostavljuje:

$$0 = -\nabla p + \eta \nabla^2 u + f_b \quad (15)$$

Ovako pojednostavljena jednadžba početak je mnogih kalkulacija u mikro i nanofluidici¹³.

Dva najčešće korištena geometrijska oblika kanala u mikrofluidici su kružnog i pravokutnog presjeka. Za oba oblika definira se srednja brzina strujanja fluida i protok fluida.

Brzina strujanja fluida, u , u mikrokanalu kružnog presjeka je:

$$u(r) = \frac{1}{4\eta} \cdot \left| \frac{dp}{dz} \right| \cdot (a^2 - r^2) \quad (16)$$

gdje je η je dinamička viskoznost fluida (Pas), p je tlak (Pa), z i r su koordinate sustava, a a je radijus cijevi (m).

Protok fluida u mikrokanalu kružnog presjeka je definiran:

$$Q = \frac{\pi a^4}{8\eta} \cdot \left| \frac{dp}{dz} \right| \quad (17)$$

gdje je η je dinamička viskoznost fluida (Pas), p je tlak (Pa), z i r su koordinate sustava, a a je radijus cijevi (m).

Srednja brzina strujanja fluida, u , u mikrokanalu kružnog presjeka je:

$$u = \frac{Q}{\pi a^2} = \frac{a^2}{8\eta} \cdot \left| \frac{dp}{dz} \right| \quad (18)$$

Brzina strujanja fluida, u , u mikrokanalu pravokutnog presjeka je:

$$u(y) = \frac{\Delta p}{2\eta L} \cdot \left(\left(\frac{h}{2} \right)^2 - y^2 \right) \quad (19)$$

gdje je η je dinamička viskoznost fluida (Pas), p je tlak (Pa), h je visina, a y je koordinata.

Protok fluida u mikrokanalu pravokutnog presjeka je:

$$Q = \frac{wh^3 \Delta p}{12\eta L} \quad (20)$$

gdje je η je dinamička viskoznost fluida (Pas), p je tlak (Pa), h je visina, a w je širina cijevi.

Srednja brzina strujanja fluida, u , u mikrokanalu pravokutnog presjeka je:

$$U = \frac{h^2 \Delta p}{12\eta l} \quad (21)$$

gdje je η je dinamička viskoznost fluida (Pas), p je tlak (Pa), h je visina, a l je duljina cijevi¹³.

Pad tlaka u mikrosustavu definiran je Darcy–Weisbachom jednadžbom:

$$\Delta p = \frac{f_D \rho u^2 l}{2a} \quad (22)$$

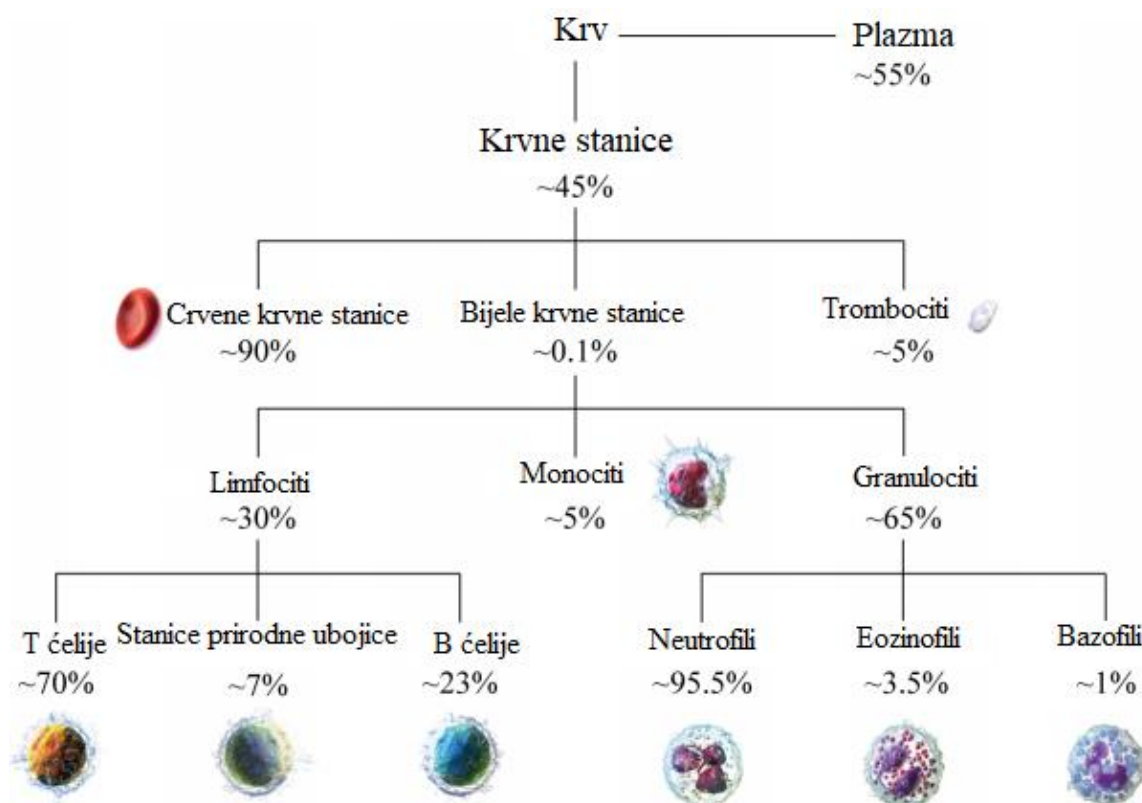
gdje je f_D koeficijent toka, ρ je gustoća fluida (kg/m³), u je brzina strujanja fluida, l je duljina cijevi, a a je radijus cijevi (m)¹⁴.

2.1.8 Krv kao fluid

Sastav krvi¹⁵

Prosječna odrasla osoba ima između 4,7 i 6 L krvi u svojem tijelu što čini oko 7% mase tijela. Primarna uloga krvi je da dovodi kisik, nutrijente i hormone stanicama te da odvodi ugljikov dioksid i metabolite iz stanica kako bi se osigurao normalan rad organizma. Krv je potrebna minuta da procirkulira kroz krvožilni sustav. Osim prijenosa nutrijenata i metabolita, krv igra jednu od glavnih uloga u imunološkom sustavu tijela i u osnovnoj prevenciji težih ozljeda zahvaljujući komponentama koje se nalaze u njoj.

Ljudska krv se može definirati kao suspenzija, 55% krvi je plazma dok su 45% krvi krvne stanice. Slikovit prikaz na Slici 13.



Slika 13. Sastav ljudske krvi¹⁵

Plazma je uglavnom sačinjena od vode, u postotku od ~90%, dok je ostatak sačinjen od elektrolita, lipida, proteina, ugljikohidrata, vitamina i minerala. Uloga plazme u ljudskom tijelu je raznovrsna jer sadrži mnogo različitih komponenata u sebi koji sudjeluju u imunološkom odazivu tijela, izgradnji stanica, održavanju pH i osmotskog tlaka.

Krvne se stanice primarno dijele na crvene krvne stanice, bijele krvne stanice i trombocite. Crvene krvne stanice u sebi imaju hemoglobin koji, uz njihov specifičan bikonkavni oblik, omogućuje vezanje kisika i ugljikovog dioksida te im je primarna zadaća transport kisika od pluća do stanica te odvod ugljikovog dioksida iz stanica do pluća. U laboratorijskim pretragama postotak koncentracije crvenih krvnih stanica u krvi naziva se hematokrit. Bijele krvne stanice su dio imunološkog sustava koji štiti organizam od stranih tvari i mikroorganizama, a dijele se u limfocite, monocite i granulocite. Limfociti stvaraju anti-tijela kao odgovor na antigen strane materije koja se nađe u krvi i tako ih deaktiviraju. Monociti su jedni od ključnih komponenti za proces fagocitoze, odnosno u uklanjaju mrtvih ćelija i staničnog otpada. Granulociti pak proizvode tvari koje su toksične za mnoge mikroorganizme i na taj način pridonose imunološkom sustavu. Posljednji tip krvnih stanica, trombociti, ključni su za stvaranje krvnih ugrušaka na mjestima na kojima je došlo do oštećenja krvnih žila. Osnovna svojstva krvnih stanica dana su u Tablici 2.

Tablica 2. Svojstva krvnih stanica¹⁵

Tip krvne stanice	Promjer (µm)	Volumen (µm³)	Gustoća (g/cm³)	Koncentracija (stanice/mL)	Stlačivost (T/Pa)
Crvene krvne stanice	6-9	80-100	1,089-1,100	4,2-5,4x10 ⁹	334
Bijele krvne stanice	5,5-12	160-450	1,055-1,085	0,4-1,1x10 ⁷	393
Limpfociti	5,5-10	161-207	1,055-1,070	1-4,8x10 ⁶	
Monociti	7,5-12	382-449	1,055-1,070	1-8x10 ⁵	
Granulociti	8,5-11	239-382	1,075-1,085	2,1-6,6x10 ⁶	
Trombociti	2-4	5-10	1,04-1,06	2,1-5x10 ⁸	

Krv se stvara procesom zvanim hematopoeza koji se odvija u koštanoj srži.

Svojstva krvi

Osim sastava krvi koji daje određeni uvid u kompleksnost krvi kao fluida, postoje najbitnija svojstva koja utječu na reološko ponašanje krvi. U tekstu su već spomenute najbitnije: gustoća, viskoznost i stlačivost.

Gustoća cijele krvi varira u vrijednosti od 1010 do 1060 kg/m³ ¹⁶.

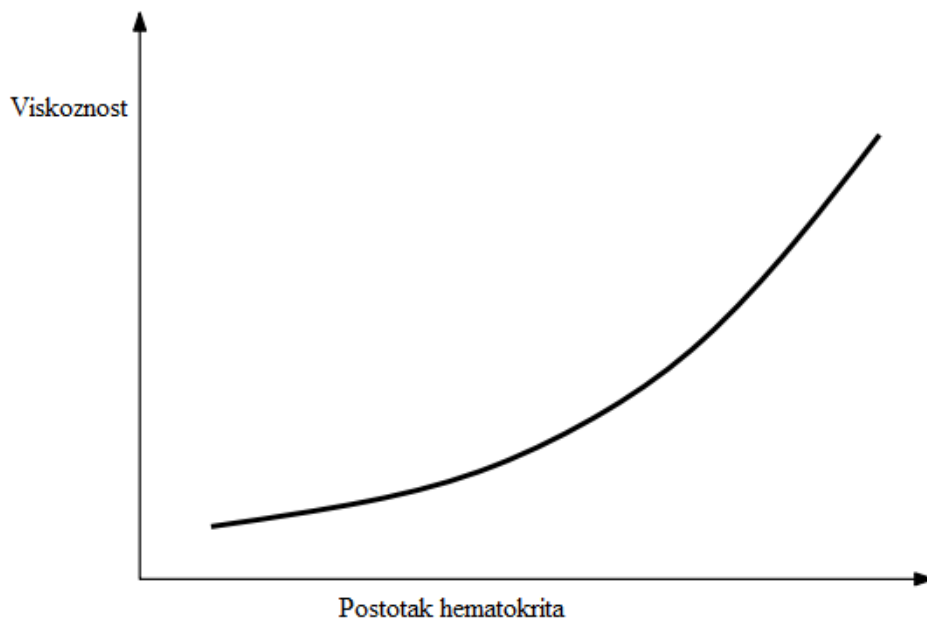
Dinamička viskoznost krvi pri normalnoj tjelesnoj temperaturi je 2,78-2,82 mPas, dok je kinematička viskoznost 2,65-2,70 mm²/s. Viskoznost krvi varira u ovisnosti o temperaturi i povećavanjem temperature ona se smanjuje¹⁷.

Krv se, kao i druge tekućine, smatra generalno nestlačivom, odnosno stlačivom u nezamjetnoj količini. Međutim, kao što je vidljivo u Tablici 2., to ne vrijedi za sve komponente krvi, crvene i bijele krvne stanice stlačive su komponente krvi.

Reološko ponašanje krvi¹⁸

Krv je heterogena višefazna suspenzija čije je reološko ponašanje određeno svojstvima krvnih stanica i njihovom međusobnom interakcijom te interakcijom s okolinom. Na reološko ponašanje krvi utječu mnoge komponente kao što su temperatura, gustoća, viskoznost, unos tekućina, nutrijenata i medikamenata.

Viskoznost krvi određena je faktorima poput viskoznosti plazme, razine hematokrita u krvi, raspodjeli krvnih stanica i mehaničkim svojstvima krvi. Osim unutarnjih faktora, na viskoznost mogu djelovati vanjske deformacijske sile, ekstenzijske ili u obliku trenja. Ovisnost viskoznosti o postotku hematokrita vidljiva je na Slici 14.

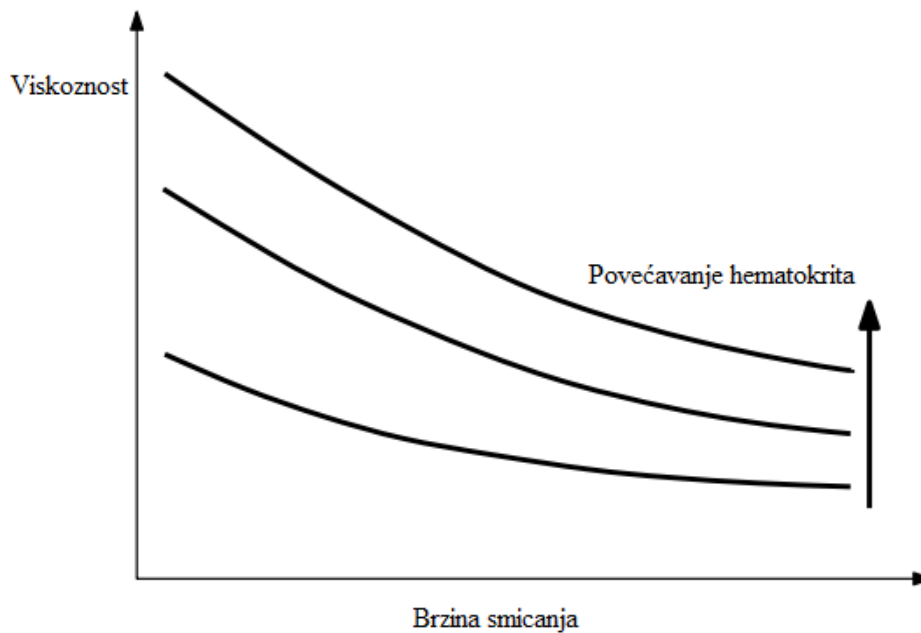


Slika 14. Ovisnost viskoznosti krvi o postotku hematokrita¹⁸

Teško je opisati reologiju krvi zato što je najveći postotak krvi plazma koja je u svom sastavu uglavnom voda. Plazma pokazuje ponašanje kao tipični Newtonov fluida i za mnoge modele toka upravo se taj tip fluida uzima kako bi se pojednostavili izračuni. Za razliku od plazme, krv

u cijelost se ponaša kao ne-Newtonov fluid i pokazuje tipična svojstva takvih fluida kao što su: viskoelastičnost, tiksotropija, postojanje granice elastičnosti i stanjivanje smicanja gdje se viskoznost smanjuje pod većim smičnim naprezanjem. Ne-Newtonovo ponašanje krvi ovisno je o brzini i tipu deformacije.

Povećavanjem brzine smicanja dolazi do stanjivanja smicanja i tiksotropije jer dolazi do deformacije nakupina crvenih krvnih stanica, a ta ovisnost može se vidjeti na Slici 15.



Slika 15. Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja¹⁸

Viskoelastična svojstva krvi proizlaze iz crvenih krvnih stanica koje imaju značajna elastična svojstva, a ona su značajnije izražena u režimima manje deformacije i pulsirajućom prirodom toka krvi.

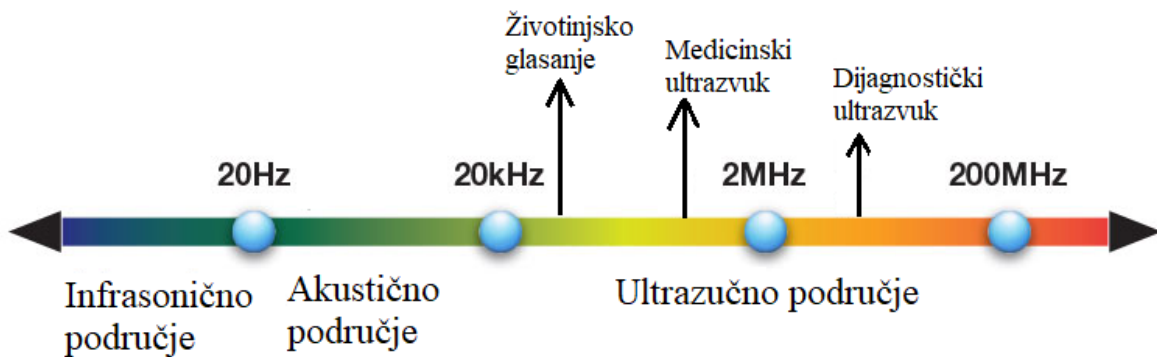
Za reološki opis krvi korišteni su mnogi modeli za ne-Newtonove fluide, od kojih su najpoznatiji Carreau-Yasuda i Cason modeli. Krv se često zna modelirati kao Newtonov fluid i to je prihvatljiva aproksimacija za mnoge slučajeve, kao na primjer za protok u većim žilama. S obzirom na to da nema striktno granice kada se za model protoka krvi uzima Newtonov fluid kao baza ili ne-Newtonov fluid, može se reći kako to ovisi o mnogim objektivnim i subjektivnim paramterima koji proizlaze iz eksperimentalnih podataka i iskustva. Generalni dogovor je da se ne-Newtonovo ponašanje krvi u obzir mora uzeti za brzinu smicanja koja je manja ili blizu 100 s^{-1} .

Kompleksnost reološkog ponašanja krvi ovisi o mikrostrukturama koje se u njoj nalaze i okolini u kojoj krv teče (tkivo, manje žile, veće žile). Dosadašnja istraživanja pokazala su kako ne-Newtonovo ponašanje fluida je od većeg izražaja u tkivima i malim žilama, dok u većim žilama ono slabo dolazi do izražaja.

2.2. Ultrazvuk

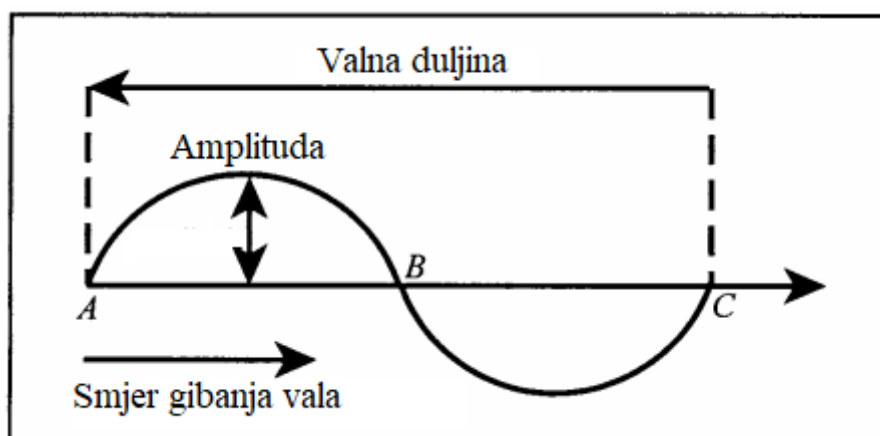
2.2.1 Definicija i ponašanje ultrazvučnih valova

Ultrazvuk je tip zvučnog vala čija je frekvencija previsoka da ju čuje ljudsko uho odnosno ona čija frekvencija je iznad 20 kHz¹⁹. Prikaz gdje se ultrazvučni valovi nalaze na skali akustičnih valova dan je Slikom 16.



Slika 16. Skala s prikazom raspona ultrazvučnih valova te gdje ih se može naći ili koristiti²⁰

Ultrazvučni val je tip akustičnog vala koji se ponaša kao tipični mehanički val. Svaki mehanički val se može okarakterizirati s par svojstava, koja su slikovito prikazana na Slici 17.



Slika 17. Prikaz mehaničkog vala²¹

Valna duljina je duljina između dvije čestice koje titraju u fazi, a broj valova koji prođu u nekoj točki za vrijeme određenog vremenskog perioda se zove frekvencija vala. Amplituda vala je najveći otklon od srednje veličine vala, kao što je označeno na Slici 18.

Akustični valovi se kroz tekućine i plinove kreću kao longitudinalni valovi, dok se u čvrstim tijelima mogu kretati kao longitudinalni i transverzalni valovi²¹. Longitudinalni valovi, poznati kao i kompresijski valovi, su valovi u kojima čestice titraju u smjeru širenja vala, a transverzalni su oni u kojima čestice titraju okomito na smjer širenja vala.

Valovi se u prostoru šire konstantnom brzinom u svim smjerovima od izvora vala. Jednadžba širenja akustičnih valova dana je formulom:

$$\frac{\partial^2 p}{\partial x^2} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} = 0 \quad (23)$$

gdje je p akustični tlak, c je brzina zvuka, x je oznaka pozicije u koordinatnom sustavu, a t je vrijeme²².

Brzina valova u fluidima je dana jednadžbom:

$$c_L = \left(\frac{K}{\rho} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (24)$$

gdje je K modul krutosti fluida, a ρ je gustoća.

U krutinama, brzina valova definirana je:

$$c_S = \left(\frac{E}{2\rho(1 + \nu)} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (25)$$

gdje je E Youngov model, ρ je gustoća i ν je Poissonov omjer¹⁹.

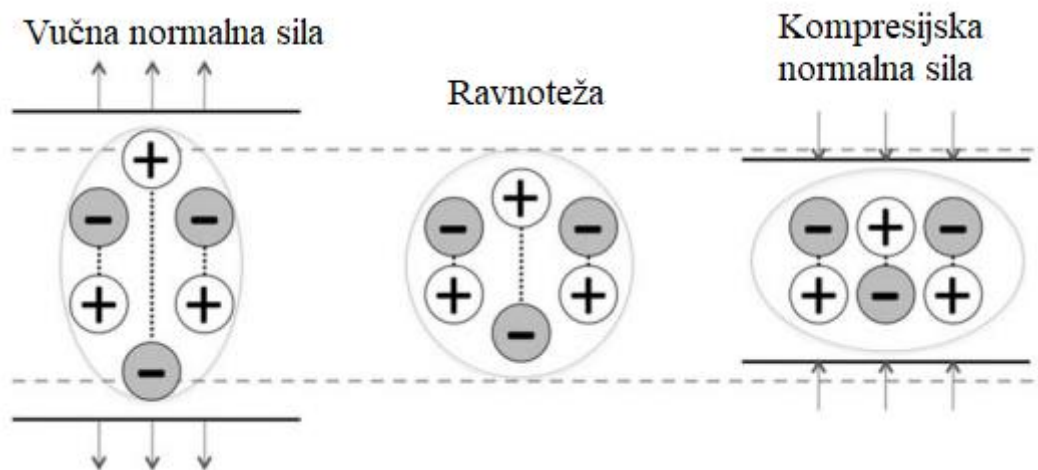
Iako se akustični valovi šire u prostoru u svim smjerovima, u praksi valja paziti na apsorpciju i refleksiju valova koje su uzrokovane interakcijom valova s okolinom.

Ultrazvuk je našao svoje mjesto u mnogim granama inženjerstva i koristi se prilikom nedestruktivnog testiranja, medicinskog snimanja, čišćenja, mjerenja svojstava materijala, ultrazvučnog rezanja i varenja, itd.

2.2.2. Piezoelektrični efekt

Piezoelektrični efekt je pojava koja se javlja kada materijali pod mehaničkim pritiskom proizvode električnu struju i obrnuto. To, naravno, nije svojstvo svih materijala, već onih koji se nazivaju piezoelektričnim kristalima.

Piezoelektrični kristali imaju dipolni moment, odnosno u njima postoji odvojenost pozitivnih i negativnih električnih naboja. Gustoća dipolnog momenta zbroj je svih dipolnih momenata podijeljen s volumenom kristala. Djelovanjem mehaničke sile, poput kompresije, okretanja ili razvlačenja materijala dolazi do preraspodjele dipolnih momenata u kristalu pri čemu dolazi do promjene u gustoći dipolnog momenta na površini i stvara se struja²³. Mehanizam piezoelektričnog efekta prikazan je na Slici 18.



Slika 18. Prikaz koncepta piezoelektričnog efekta²³

Piezoelektrični efekt odvija se u oba smjera, tako da kada se na piezoelektrični kristal narine električno polje, dolazi do promjene oblika dipola što uzrokuje mali pomak u dimenzijama materijala pri čemu se proizvodi ultrazvučni val²³.

Piezoelektrički efekt matematički se zapisuje uz pomoć Hookovog zakona naprezanja koji opisuje deformaciju materijala uslijed djelovanja mehaničke sile:

$$S = s \cdot T \quad (26)$$

gdje je S deformacija, s fleksibilnost materijala, a T naprezanje.

I uz pomoć dielektrične jednadžbe koja opisuje redistribuciju unutrašnjeg električnog naboja koje se odvija uslijed djelovanja mehaničke sile:

$$D = \varepsilon \cdot E \quad (27)$$

gdje je D gustoća naboja, ε permeabilnost, a E električno polje²³.

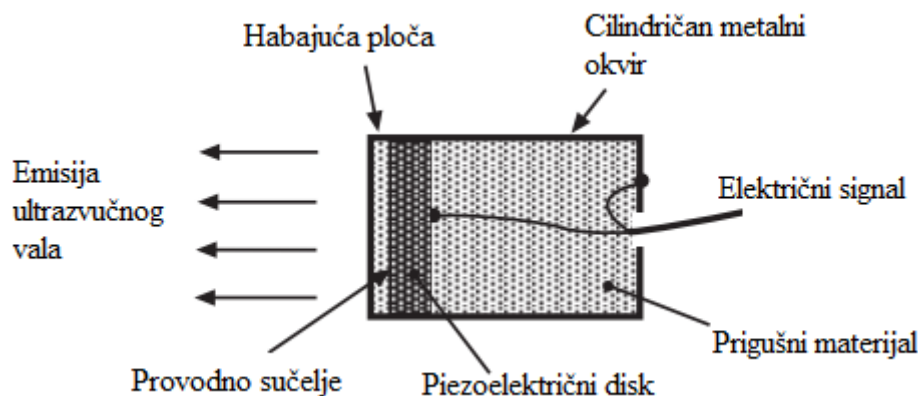
Piezoelektrični materijali mogu se naći u prirodi, a upravo na prirodnim materijalima Pierre i Jacques Curie radili su prve eksperimente dok su pokušavali opisati piezoelektrični efekt. Neki prirodni materijali mogu se vidjeti na Slici 19.



Slika 19. Neki prirodni piezoelektrični materijali²³

Iako su se mnogi prvi eksperimenti provodili na prirodnim piezoelektričnim materijalima, u suvremeno se vrijeme koriste piezoelektrične keramike i feroelektrični materijali²³.

U praksi se za proizvodnju ultrazvučnih valova koristi upravo piezoelektrični efekt. Ultrazvučni pretvarač u sebi ima piezoelektrični kristal i dovodom električne struje dolazi do pomaka u dimenzijama kristala, odnosno kristal vibrira i emitira ultrazvučne valove. Na Slici 20. prikazana je shema pretvarača ultrazvučnih valova¹⁹.



Slika 20. Shema piezoelektričnog pretvarača²³

Piezoelektrični pretvarači mogu biti korišteni u čitavom ultrazvučnom području jer mogu proizvoditi valne duljine čitavog UZV spektra.

2.3. Akustofluidika

Akustofluidika se definira kao vanjsko manipuliranje mikročestica u mikrofluidici uz pomoć ultrazvučnih valova. Ova metoda separacije omogućuje separaciju mikročestica koja se bazira isključivo na mehaničkim svojstvima poput veličine, oblika, gustoće i kompresibilnosti, a takva se separacija naziva akustoforeza. Akustoforeza ima potencijal za primjenu u mnogim biotehnološkim procesima poput: hvatanja stanica, plazmafereze, forenzičkim i prehrambenim analizama, razdvajanja stanica i stanične diferencijacije²⁴.

2.3.1. Reološko ponašanje fluida pri djelovanju UZV zračenja

U mikrofluidici vrijedi kako je brzina toka puno manja nego brzina zvučnih valova koji djeluju kao valovi pritiska u sustavu, zbog čega se fluid smatra nestlačivim. To je razlog zašto se gustoća smatra konstantnom u vremenu i prostoru pa vrijedi jednačina kontinuiteta²⁴:

$$\partial_i v_i = 0 \quad (28)$$

Gibanje fluida u mikrosustavu na koji utječe UZV val opisuje se Navier-Stokesovom jednačinom za stlačive fluide:

$$\rho[\partial_t v + (v \nabla) v] = -\nabla p + \eta \nabla^2 v + \beta \eta \nabla (\nabla v) + \rho g \quad (29)$$

Gdje je β ($\approx 5/3$ za vodu i jednostavne tekućine) omjer koeficijenta viskoznosti.

Dok za nestlačive fluide vrijedi:

$$\rho[\partial_t v + (v \nabla) v] = -\nabla p + \eta \nabla^2 v + \rho g \quad (30)$$

Strujanjem fluida dolazi do gibanja atoma, molekula ili agregata koji se nalaze u fluidu pri čemu mora doći i do prijenosa topline. Toplina se prenosi unutar samog fluida, ali i s fluida na stijenku te sa stijenke na fluid. U postupcima akustoforeze dolazi do korištenja UZV valova koji su poznati po podizanju temperature sustava na koji djeluju što je jedna od komponenata na koje se mora obratiti pozornost prilikom izrade mikroreaktora.

Općenito u mikrofluidici, zbog malih brzina gibanja fluida u odnosu na brzinu zvučnih valova koji utječu na fluid, tlak se može aproksimirati kao konstanta. U tom slučaju jednadžba za prijenos topline glasi²⁴:

$$\rho c_p [\partial_t T + (v_j \partial_j) T] = \partial_j (\kappa \partial_j T) + \sigma_{jk} \partial_k v_j \quad (31)$$

Pitanje koje se postavlja je sljedeće, kako najjednostavnije opisati gibanje fluida u mikrosustavima kako bi se najlakše došlo do kalkulacija za izradu mikroreaktora i predvidjelo ponašanje fluida. Navier-Stokesova jednadžba je fantastična jednadžba za opis gibanja. Međutim, isto tako je i komplicirana zbog nelinearnog segmenta za kojeg ne postoji jedinstveno rješenje.

Postoje dva slučaja kada se nelinearni dio Navier-Stokesove jednadžbe može zanemariti. Prvi slučaj se odnosi na male brzine protoka fluida pri čemu se nelinearni segment može zanemariti zbog značajno manje brojčane vrijednosti od viskoznog člana jednadžbe. U tom slučaju fluid ulazi u laminarni hidrodinamički režim koji se naziva Stokesovo gibanje ili puzajući tok. Drugi slučaj vrijedi za sustave gdje ulogu igra sama geometrija mikrosustava odnosno kada su kanali dugi i ravni dolazi do translacijske simetrije pri čemu se nelinearni dio jednadžbe može zanemariti. Takvo gibanje se pak naziva Poiseuilleov tok²⁴.

Stokesovo gibanje

Stokesovo se gibanje javlja pri malim brzinama protoka fluida što uvjetuje laminarni hidrodinamični režim. U mikrofluidici viskoznost dominira nad gravitacijskom silom i više utječe na režim stoga je potrebno odrediti Reynoldsovu značajku (jed.10). Za $Re \ll 1$, što je veoma često u mikrofluidici u kojoj je ta značajka veoma mala, vrijedi linearna Stokesova jednadžba:

$$0 = -\nabla p + \eta \nabla^2 v \quad (32)$$

Bitan primjer Stokesovog gibanja je gibanje čestičnih otopina. U situaciji gdje postoji sferična čestica radijusa a koja se kreće brzinom v_p , pod utjecajem vanjske sile, kroz fluid koji se kreće brzinom v i za koju vrijedi "no slip" rubni uvjet vrijedi:

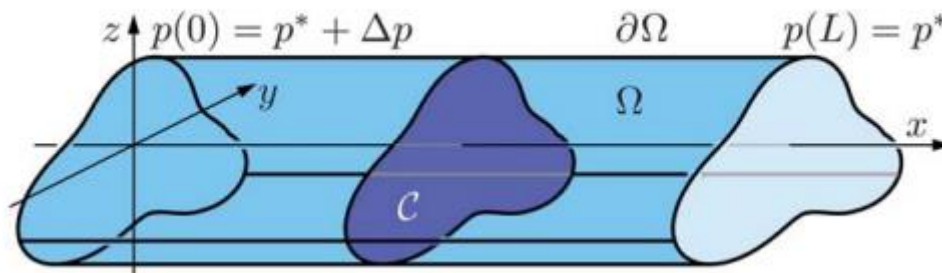
$$F_{drag} = 6\pi\eta a \cdot (v - v_p) \quad (33)$$

Gdje je F_{drag} sila otpora čestice naspram fluida.

Mala promjena koncentracije čestica ne utječe znatno na profil strujanja, ali značajno utječe na viskoznost sustava²⁴.

Poiseuilleovo gibanje

Poiseuilleovo gibanje je gibanje fluida u stabilnom toku u ravnoj cijevi koje uzrokuje razlika u tlaku na krajevima cijevi. Ovakav tok se može najlakše objasniti ako se zamisli fluid koji prolazi kroz dugačku cijev koja je položena horizontalno uz x-os pri čemu uz z-os djeluje gravitacija koja je u ravnoteži s hidrostatskim tlakom. Poprečni je presjek konstantan uz x-os stoga je fluid pod utjecajem sile razlike tlakova te pod takvim uvjetima, vrijedi linearna Stokesova jednadžba. Slikoviti Poiseuilleov tok vidljiv je na Slici 21²⁴.



Slika 21. Poiseuilleov tok u ravnom kanalu (Ω) gdje C označava poprečni presjek fluida²⁴

Brzina i protok u kanalu kružnog poprečnog presjeka su definirani:

$$v(x, z) = \frac{\Delta p}{4\eta L} \cdot (a^2 - y^2 - z^2) \quad (34)$$


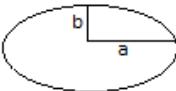

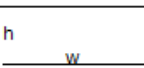

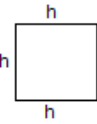

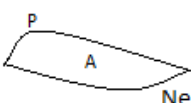
$$Q = \frac{\pi a^4}{8\eta L} \cdot \Delta p \quad (35)$$

Zanimljiva pojava koja se javlja u mikrofluidici hidraulički je otpor koji je posljedica konstantnog protoka koji je pak posljedica konstantnog pada tlaka u sustavu. Ta pojava može biti definirana Hagen-Poiseuilleovim zakonom u sljedećem obliku²⁴:

$$R_{hyd} = \frac{\Delta p}{Q} \quad (36)$$

Gdje je R_{hyd} hidraulički otpor.

Na Slici 22. su prikazane neke jednadžbe i vrijednosti R_{hyd} hidrauličkog otpora koje su dobivene izračunom za fluid $\eta = 1\text{mPas}$, $L = 1\text{m}$, $a = 100\ \mu\text{m}$, $b = 33\ \mu\text{m}$, $h = 100\ \mu\text{m}$ i $a = 300\ \mu\text{m}$. Hagen-Poiseuilleov zakon analogan je Ohmovom zakonu.

Oblici i parametri	R_{hyd}	$R_{hyd} \left[10^{12} \frac{\text{Pa s}}{\text{m}^3} \right]$
 Krug	$\frac{8}{\pi} \eta L \frac{1}{a^4}$	25
 Elipsa	$\frac{4}{\pi} \eta L \frac{1 + (b/a)^2}{(b/a)^3} \frac{1}{a^4}$	393
 Trokut	$\frac{320}{\sqrt{3}} \eta L \frac{1}{a^4}$	1850
 Dvije paralelne ploče	$12 \eta L \frac{1}{h^3 w}$	40
 Pravokutnik	$\frac{12 \eta L}{1 - 0.63(h/w)} \frac{1}{h^3 w}$	51
 Kvadrat	$28.4 \eta L \frac{1}{h^4}$	284
 Parabola	$\frac{105}{4} \eta L \frac{1}{h^3 w}$	88
 Nepravilno područje	$\approx 2 \eta L \frac{P^2}{A^3}$	—

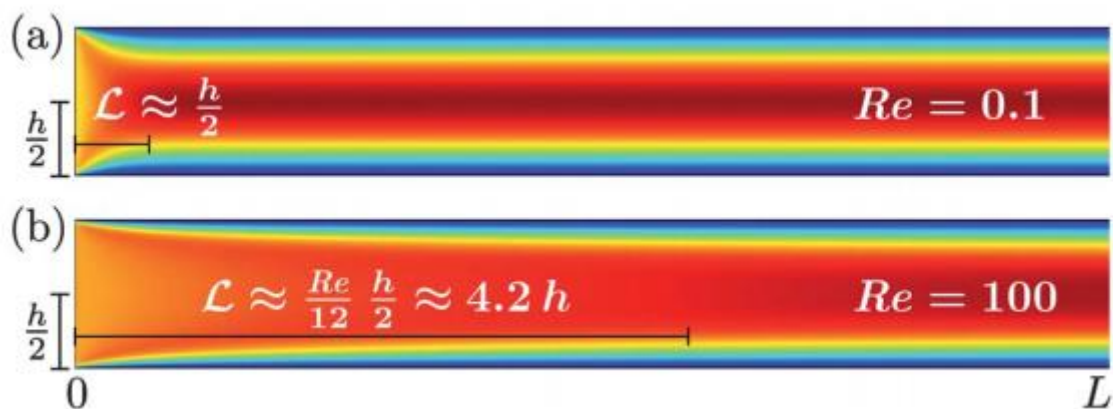
Slika 22. Prikaz izračuna hidrauličkog otpora i neke njegove vrijednosti²⁴

Zakoni skaliranja u mikrofluidici

Zakoni skaliranja pokazuju kako se zavisna varijabla mijenja s promjenom nezavisnih varijabli te daju uvid u razumijevanje sustava kojeg se promatra i olakšavaju njegovu dimenzijsku analizu.

Primjer zakona skaliranja i dimenzijske analize je bitan za Poiseuilleovo gibanje prilikom čega se promatra promjena protoka fluida. Do promjene protoka, Q , dolazi s promjenom pada tlaka, geometrije sustava, viskoznosti i gustoće fluida. Prema izračunu protoka u cijevi kružnog presjeka (jed.34) vidljivo je kako je pri istom padu tlaka s povećanjem duljine kanala protok fluida sve manji. To direktno pokazuje utjecaj geometrije na protok pri čemu se može definirati proporcionalnost $Q \propto \Delta p / \eta L$ i veoma bitna ovisnost protoka na najmanje promjene dimenzija poprečnog presjeka odnosno radijusa za kružni poprečni presjek i visinu za paralelne ploče²⁵.

Posebnu pažnju treba posvetiti dimenzijama ulaza u sam mikroreaktor jer u akustofluidici veoma često postoji više različitih vodova koji ulaze u glavni kanal u kojem se odvija akustoforeza.

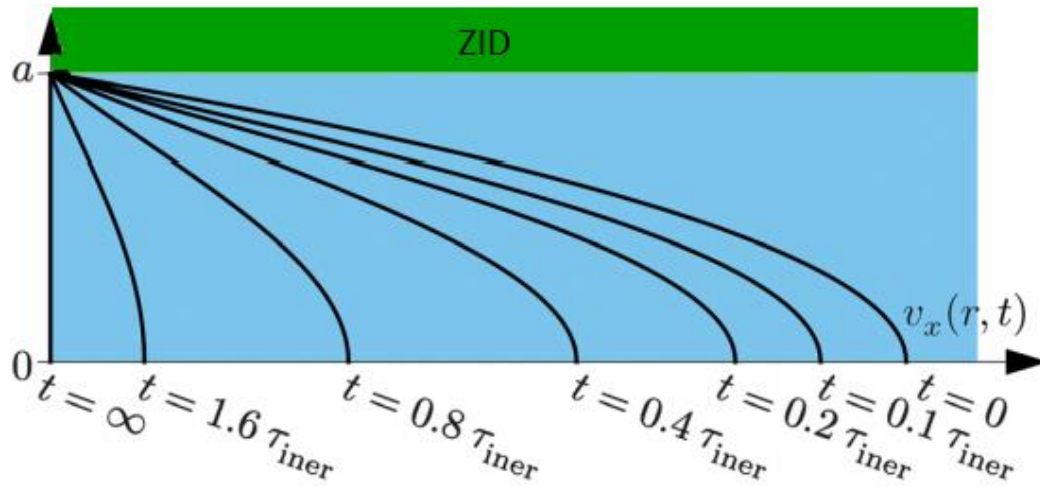


Slika 23. Prikaz promjene brzine protoka fluida u sustavu između dvije paralelne ploče²⁵

Na Slici 23. prikazane su brzine uz pomoć obojenja gdje plava boja označava dijelove kanala u kojemu fluid ne teče, a tamno crvena označava dijelove gdje fluid postiže maksimalnu brzinu. U gornjem kanalu (a) teče fluid koji je okarakteriziran malim Reynoldsovim brojem i vidljivo je kako se Poiseuilleovo gibanje potpuno uspostavlja za duljinu ulaza koje je približno jednaka polovici visine, dok je za fluid okarakteriziran većim Reynoldsovim brojem (b) koji odgovara vrijednosti $\left(\frac{Re}{24}\right) h$ ²⁵. Utvrđena je proporcionalnost za dimenziju ulaznog kanala $L \approx \left\{l, \frac{Re}{12} l\right\}$.

Drugi je primjer inercijski referentni okvir za sustav, kojeg je od interesa odrediti unatoč dominaciji viskozne sile u mikrofluidici. Inercijski referentni okvir se odnosi na vremensku

skalu u kojoj se vidi utjecaj inercije na protok tekućina. Prikaz utjecaja inercije na protok tekućina vidljiv je na Slici 24.

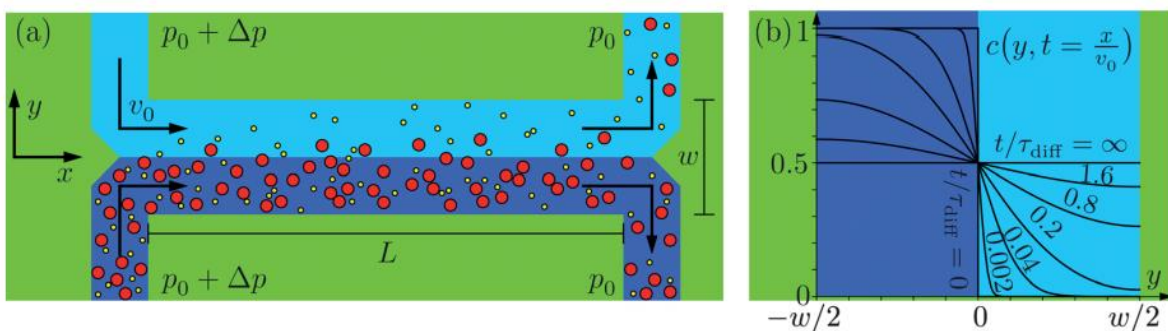


Slika 24. Prikaz Poiseuilleove parabole u vremenu za usporavajući protok²⁵

Na gornjoj slici prikazano je što se dogodi u sustavu kada pokretačka sila, Δp , dođe na nulu odnosno kada na sustav prestane djelovati sila i tekućina se polako prestane kretati. Vrijeme potrebno za zaustavljanje tekućine nakon prestanka djelovanja sile zove se inercijsko vrijeme zaustavljanja i opisano je zakonom skaliranja²⁵:

$$\pi_{iner} \approx \frac{a^2}{4\nu} \quad (37)$$

Treći primjer važnog zakona skaliranja je molekularna difuzija. Veoma čest slučaj u akustofluidici je manipuliranje biološkim stanicama i to se čini transferom iz jednog laminarnog protoka u drugi paralelni tok. Slikovit prikaz na Slici 25.



Slika 25. Prikaz transfera molekula iz jednog paralelnog toka u drugi te profili koncentracije kao funkcije smjera y na različitim pozicijama x ²⁵

Na gornjoj slici prikazan je tzv. H-filter koji se sastoji od centralnog kanala duljine L i širine w s dva otvora s lijeve i desne strane. Svijetlo plavom bojom označen je čisti pufer, a tamno plavom bojom suspenzija pufera te molekula različitih veličina pri čemu su veće označene crvenom, a manje žutom bojom.

U većini slučajeva gdje se koristi akustofluidika, ne dolazi do kemijske reakcije, stoga se sustav prikazan na Slici 25. i njegovo miješanje može opisati prvim Fickovim zakonom:

$$J_{\alpha} = -D_{\alpha} \nabla c_{\alpha} v \quad (38)$$

Gdje je J_{α} trenutna gustoća sustava, D_{α} difuzivnost, c_{α} koncentracija te v brzina pufera u paralelnom kanalu.

Promatrajući molekularnu difuziju sustava, često se uvodi Pécletov broj:

$$Pé = \frac{av}{D_{\alpha}} \quad (39)$$

Vrijednost Pécletovog broja je važna za određivanje dominira li u sustavu difuzija ili advekcija, zbog čega se često spominje sličnost Pécletovog i Reynoldsovog broja.

Promatranjem sustava u kojem se pokušavaju razdvojiti čestice H-filterom definirani su utjecaji na efikasnost separacije odnosno skalarni zakoni koji na nju najviše utječu, a to su brzine protoka otopine i pufera te vrijeme difuzije ($\pi_{dif,\alpha} = w^2/8 D_{\alpha}$).

Izdvojeni su najvažniji skalarni zakoni koji donose neku predodžbu o ovisnosti određenih karakteristika sustava o varijablama koje se za svaki sustav moraju uzeti u razmatranje kako bi se napravio uspješan i efikasan sustav²⁵.

2.3.2. Ultrazvučni utjecaj na sustav mikrofluidike

Akustične rezonance i brzina akustoforeze

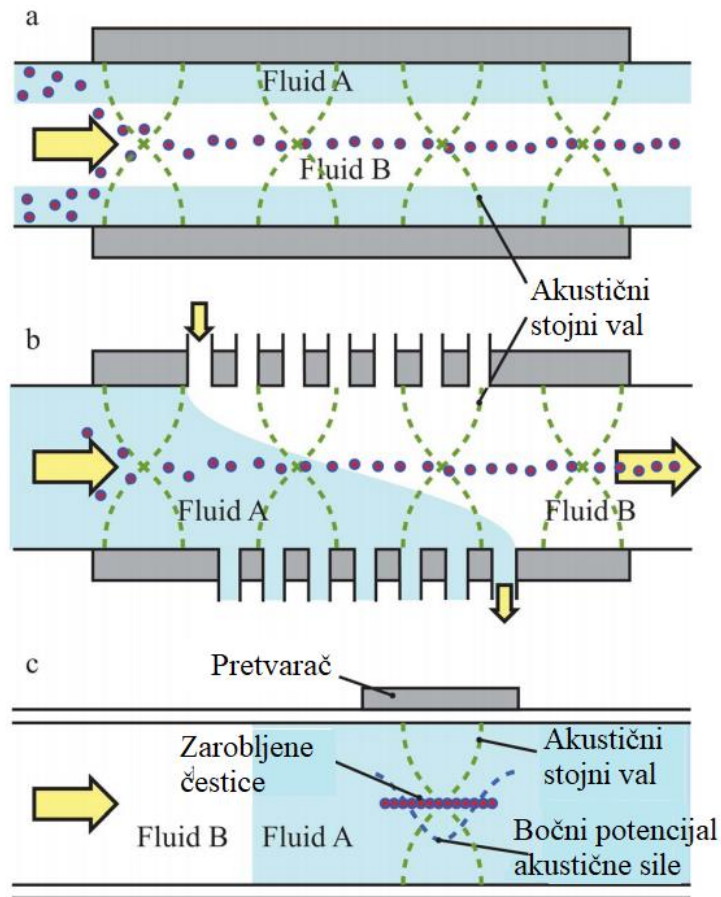
Primarna zadaća u akustofluidici transfer je suspendiranih mikročestica ili bioloških stanica pod utjecajem ultrazvučnog zračenja. Potencijal sile UZV zračenja leži u lokalnom izobličenju u rezonantnom zvučnom polju zbog raspršenja čestica. Jednodimenzionalna, dvodimenzionalna i trodimenzionalna rezonantna akustička polja projektiraju se preko fluidom popunjenih šupljina s akustičnim tvrdim zidovima²⁶. Akustični tvrdi zid granični je uvjet koji se odnosi na interakciju tekućine s beskonačno tvrdim zidom koji ne popušta pod brzinom tekućine s kojom je u interakciji. Teorijski sustav s beskonačno tvrdim zidom mogu biti dovedeni u rezonance za frekvencije kada vrijedi:

$$f_{n_x, n_y, n_z} = \frac{c_0}{2} \sqrt{\frac{n_x^2}{l^2} + \frac{n_y^2}{w^2} + \frac{n_z^2}{h^2}} \quad (40)$$

Gdje su l, w, h dimenzije kanala, c_0 je brzina zvuka u fluidu, a n_x, n_y, n_z su brojevi 1/2 valnih duljina uz svaku dimenziju prostora²⁷.

Zakoni skaliranja upućuju da na akustične rezonance najviše utječe duljina kanala pa što je duži kanal manja je separacija rezonantnih frekvencija i više rezonanci je zadržano unutar širine pojasa zadane frekvencije²⁵.

Mikročestice ili stanice se mogu manipulirati UZV-om do protoka od 30 cm/s, a sila primarnog akustičnog zračenja PRF (*eng. primary acoustic radiation force*) te utjecaj na mikročestice i stanice proizlazi iz intrinzičnih svojstava čestice što znači da postoje minimalne restrikcije za odabir čvrste faze za odvajanje. Ekstrakcija čestica iz kompleksnih uzoraka se najčešće vrši u mikrosustavu na kojeg djeluje UZV zračenje u modu 1/2 valne duljine gdje se čestice prenose iz jednog fluida u čvor stojnog vala koji se nalazi u drugom fluidu. Slikovit prikaz nalazi se na Slici 27.



Slika 26. Shema tri operacijska moda za ekstrakciju mikrokuglica uz pomoć PRF-a²⁶

Slika 26. prikazuje tri različita modela za ekstrakciju mikrokuglica iz kompleksnog uzorka (A) u čisti fluid (B). U slučaju (a) vidljivo je kako su protoci oba fluida laminarnog protoka i kako se čestice prenose transverzalno u odnosu na protok, u slučaju (b) mikrokuglice su zadržane u sredini kanala prilikom čega se fluid A odvodi iz sustava te slučaj (c) gdje su čestice zadržane u regiji protoka u lokalnom akustičnom polju. Na stanice izložene rezonantnom akustičnom polju, p_1 , djelovat će sila F_{rad} i gradijent akustičnog tlaka.

$$p_1 = p_a \cos \cdot (k_y y) \quad (41)$$

$$\Phi = \frac{1 - \kappa'}{3} + \frac{\rho' - 1}{2\rho' + 1} \quad (42)$$

$$F_{rad} = 4\pi\Phi a^3 k_y E_{ac} \sin(2k_y y) e_y \quad (43)$$

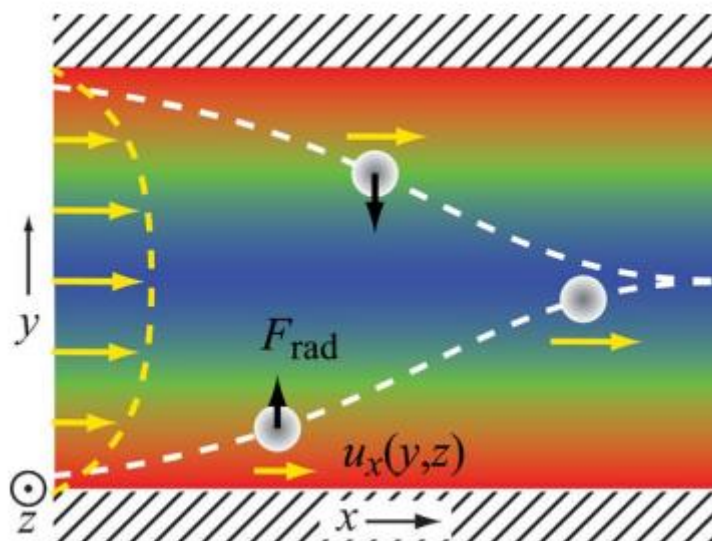
$$E_{ac} = \frac{p_a^2 \kappa_0}{4} \quad (44)$$

Gdje je p_1 polje tlaka amplitude p_a , $y = 0$ na stijenka cijevi, a je radijus čestice, $k_y = 2\pi/\lambda$ je vektor vala, E_{ac} je gustoća akustične energije, Φ je kontrastni faktor akustoforeze, κ je kompresibilnost fluida nositelja, a κ' i ρ' su relativne kompresibilnost i gustoća čestice s obzirom na fluid nosača.

Većina čestica pod utjecajem PRF-a migrira prema čvoru stojnog vala koji se nalazi u sredini kanala, ali ukoliko je čestica više stlačiva nego voda onda se kreću prema stijenka kanala. Čestice koje se kreću u takvom sustavu imaju svoju brzinu koja se definira:

$$u_{rad} = \frac{2\Phi}{3\eta} \cdot a^2 k_y E_{ac} \sin \cdot (2k_y y) \quad (45)$$

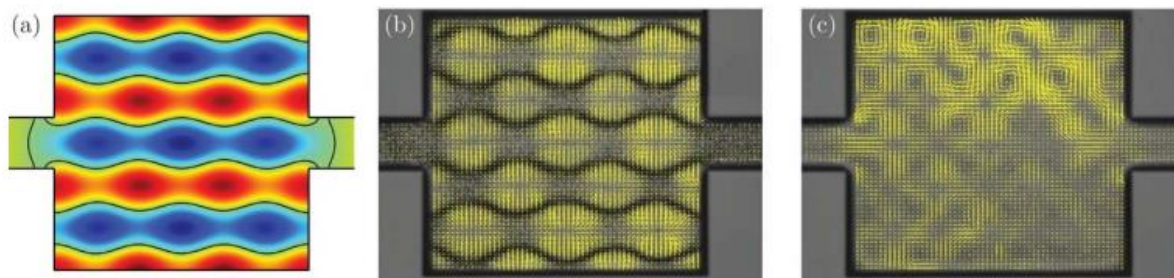
Protokom suspenzije kroz akustičnu šupljinu putanja čestica u njoj će biti vođena silom akustičnog potencijala i Poiseuilleovim tokom (Slika 27.). Protok uglavnom diktira parabolično strujanje kroz kanal (Poiseuilleov tok), a ovisi o poziciji čvrstih čestica po poprečnom presjeku kojeg pak diktira PRF.



Slika 27. Shema putanja čestica koje se nalaze u fluidu koji teče kroz PRF²⁶

Na Slici 27. plavom bojom označen je minimum PRF-a koji se nalazi u sredini kanala, a vidljiv je i smjer sile F_{rad} koji djeluje na česticu²⁶.

Ekperimentalni prikaz utjecaja UZV zračenja na mikrosustav vidljiv je na Slici 28.

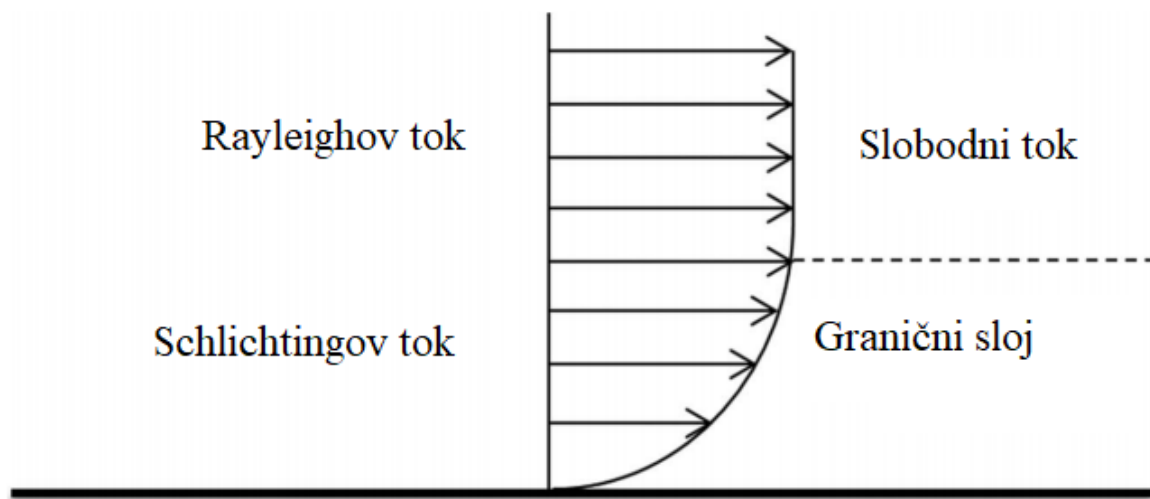


Slika 28. Prikaz utjecaja UZV zračenja na mikrosustav koji rezultira akustičnim tokom p pod utjecajem 2,17 MHz UZV zračenja u silikon-staklo mikrosustavu dimenzije 2 mm x 2mm i dubine 0,2 mm²⁷

Na Slici 28. (a) vidljivo je očekivano tlačno polje gdje crvena boja označava pozitivno, zelena nulu, a plavo negativno tlačno polje nacrtano u računalnom programu. Slika 28. (b) je fotografija koja pokazuje kretanje polistirenskih kuglica (promjer 5 μm) u kretanju pod utjecajem UZV zračenja, kuglice su označene žutom bojom i akumulirale su se na čvorovima polja nakon 1s, brzina kretanja je 1 m/s. Na Slici 28. (c) prikazane su polistirenske kuglice (promjera 1 μm) u istim uvjetima kao (b), ali gdje Stokesova vučna sila jača od akustične sile tako da ne dolazi do akumulacije čestica na čvorovima polja.

Akustični tok

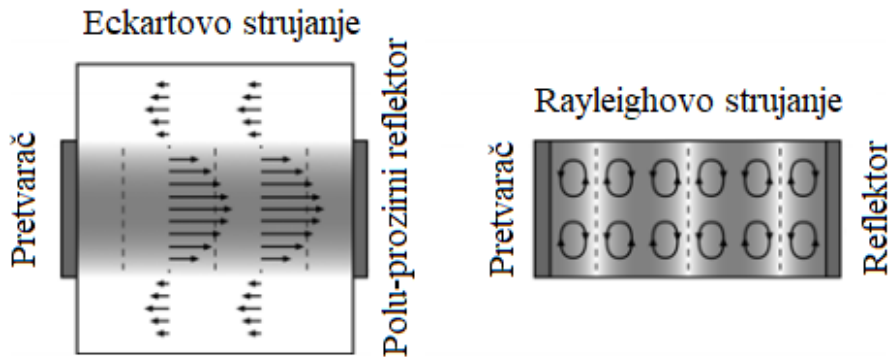
Postoje dva najčešća akustična toka, prvi se naziva Eckartov tok te je posljedica prostornog slabljenja valova u prostoru i pojavljuje se kod fluida s visokom vrijednošću Reynoldsove značajke. Slabljenje valova u prostoru uzrokuje smanjenje tlaka i brzinu amplituda u smjeru širenja vala te kroz vrijeme rezultira u neto sili istog smjera²⁸. Drugi tok se naziva i Rayleighov tok te je posljedica inercije između fluida i stijenke kanala. Kada stijenka vibrira u dodiru s fluidom dolazi do raspršenja vala uslijed kolizije s čvrstim predmetom, kada se stojni val nalazi u rezonantnoj ćeliji. Ovaj akustični tok je pak posljedica Schlichtingovog toka koji je ograničen na područje graničnog sloja koji se još naziva i Stokesov sloj (Slika 29.)



Slika 29. Prikaz hidrodinamičkog graničnog sloja i podjele tokova²⁹

U graničnom sloju dolazi do akustičnog toka koji je posljedica viskoznog rasipanja akustičke energije u fluid s čvrste stijenke, a očituje se u šupljinama fluida gdje je barem jedna dimenzija usporediva s valnom duljinom i okomita na akustični val. Rasipanje u graničnom sloju je veliko zbog velikog gradijenta brzine koje se stvara okomito na stijenk u kanala i smjer širenja valova. Do tog velikog gradijenta dolazi zbog uvjeta da je brzina fluida na stijenci kanala jednaka nuli što rezultira akustičnoj brzini jednakoj nuli na stijenci kanala do maksimalne brzine u slobodnom toku. Akustično zračenje u sustavu ima fiksirane čvorove i anti-čvorove koji se nalaze na određenoj udaljenosti što ima za posljedicu stalni moment protoka koji se kreće od anti-čvorova prema čvorovima blizu stijenke kanala i vrtložnog je karaktera. Vrtložno kretanje fluida unutar graničnog sloja naziva se Schlichtingov tok koji generira vrtložno gibanje fluida u suprotnom smjeru izvan graničnog sloja, koje se naziva Rayleighov tok²⁹.

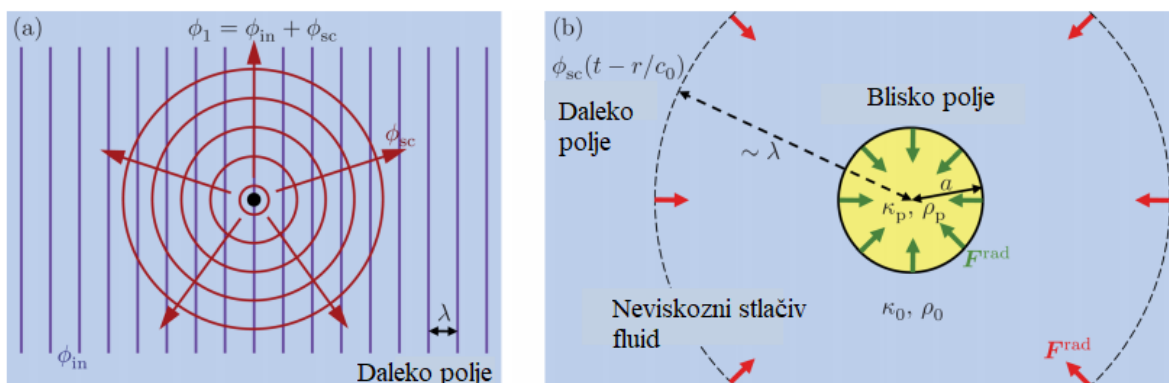
S druge strane, Eckartov tok je tok koji se formira rasipanjem akustične energije u masi fluida gdje je dio energije apsorbiran od strane fluida. Amplituda akustičnog vala slabi što dovodi do smanjenja djelovanja akustičnog polja tlaka s udaljavanjem od izvora UZV zračenja. Gubitak energije rezultira momentom protoka koji formira mlaz tekućine unutar akustičnog vala u smjeru propagacije UZV zračenja²⁹. Prikaz usporedbe Rayleighovog toka s Eckartovim vidljiv je na Slici 30.



Slika 30. Ilustracija Rayleighovog i Eckartovog toka³⁰

2.3.3. Utjecaj UZV zračenja na čestice u mikrosustavu

Prolaskom suspenzije kroz mikrosustav na koji utječu akustični valovi visoke frekvencije, odnosno UZV valovi, javlja se fenomen strujanja čestica. Minijaturni ultrazvučni pretvarač stvara akustične stojne valove koji se kreću kroz sustav, zaustavljajući ili levitirajući čestice u centru kanala³¹. Glavni utjecaj na čestice ima sila akustičnog zračenja, F_{rad} , pri čemu se čestice smatra kompresibilnim, sferičnim, mikročesticama radijusa, a , u fluidu pod utjecajem polja zračenja valne duljine, λ . Na Slici 31. prikazan je utjecaj sila u akustofluidici na česticu koja se nalazi u najjednostavnijem sustavu pri čemu se uzima da je fluid neviskoznan³².



Slika 31. Prikaz utjecaja sile akustične radijacije na česticu u neviskoznom fluidu³²

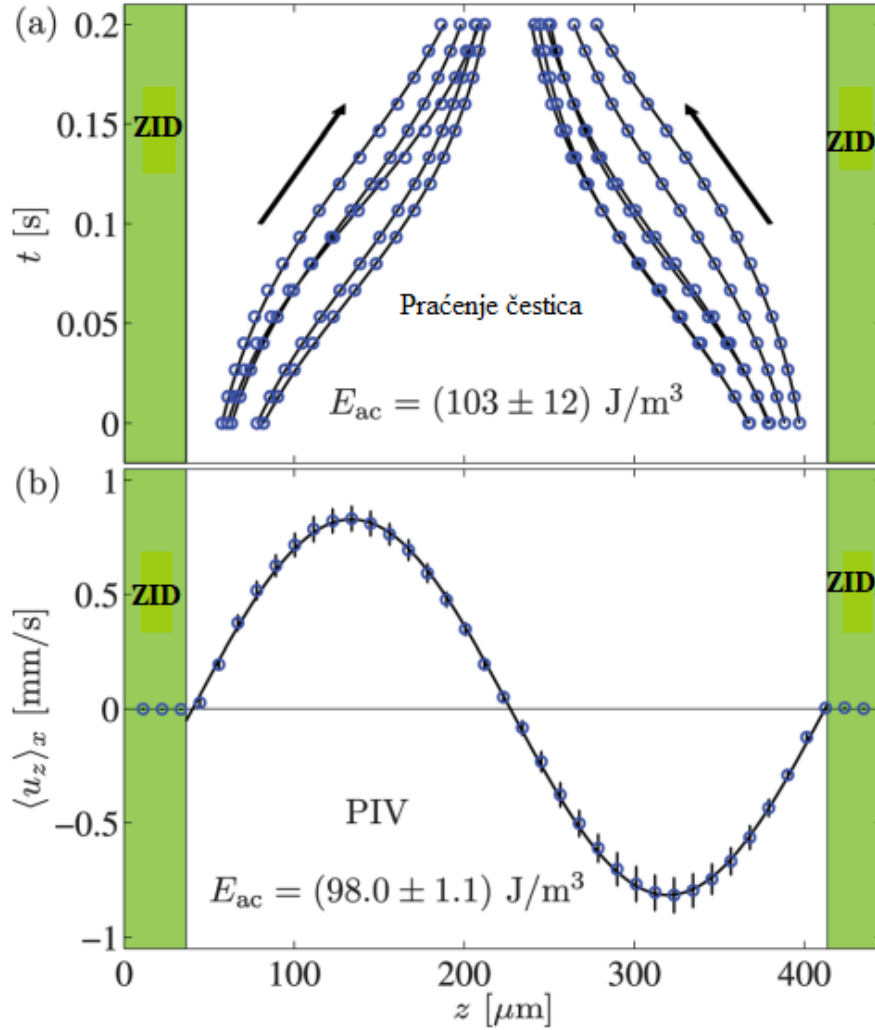
Na slici (a) prikazano je daleko polje zračenja pri čemu je crna točka u sredini ilustrativnog prikaza čestica na koju utječe UZV zračenje. Dolazeći val zračenja ima određeni potencijal, Φ_{in} , i u sudaru s česticom dolazi do raspršenja vala čiji se potencijal zatim označava s Φ_{sc} . Akustično polje prvog reda se u tom slučaju može definirati potencijalnom Φ_1 za kojeg vrijedi:

$$\Phi_1 = \Phi_{in} + \Phi_{sc} \quad (46)$$

Daleko polje definiramo kao područje gdje je radijus raspršenog zračenja značajno veći od valne duljine zračenja, $r \gg \lambda$. Na slici (b) prikazana je sferična, kompresibilna čestica radijusa, a , kompresibilnosti, κ_p , te gustoće ρ_p , koja je okružena fluidom kompresibilnosti κ_0 i gustoće ρ_p . Osim već definiranog dalekog polja, vidljivo je i blisko polje gdje je radijus raspršenog zračenja značajno manji od valne duljine zračenja, $r \ll \lambda$. U bliskom polju vrijedi potencijal $\Phi_{sc}(t)$ dok u dalekom polju vrijedi potencijal $\Phi_{sc}\left(t - \frac{r}{c_0}\right)$. Sila radijacije, F_{rad} , je jednaka na površini čestice i u području dalekog polja. Ovakav način prikaza i promatranja sustava, iz točke gledišta čestice koja se nalazi u centru koordinatnog sustava naziva se teorija raspršenja. Ovakav prikaz najjednostavniji je mogući prikaz zbog početnog uvjeta da je fluid u kojem se čestica nalazi neviskozan. U stvarnosti, takav fluid ne postoji stoga se prilikom računanja parametara sustava u obzir mora uzeti viskoznosti što rezultira u korekciji monopolnog i dipolnog koeficijenta (f_1, f_2) prilikom računanja. Monopolni koeficijent opisuje utjecaj čestica na maseni protok, a dipolni koeficijent opisuje translacijsko gibanje čestica, međutim za potrebe ovog rada nije potrebno ulaziti u njihov daljnji matematički izraz³².

Putanja čestica u akustoforezi

Ova tema započeta je u poglavlju 2.3.2 gdje je pokazana generalna shema kretanja čestice pod utjecajem UZV zračenja te definirana njezina brzina. U ovom dijelu će se pokazati ilustracija eksperimentalne validacije te teorije isto kao i maloprije navedene teorije raspršenja. Sustav se postavio tako da je mikrokanal paralelan s x-osi, a UZV zračenje transverzalni val koji se širi u smjeru osi z što znači da je putanja čestice određena vremenski ovisnim koordinatama ($x(t), y(t)$). Za mikročestice koje se sporo gibaju kroz kanal, mogu se zanemariti sile inercije i determinirati transverzalni put, $z(t)$, izjednačavajući silu akustičkog zračenja, F_{rad} , i Stokesovu silu inercije, F_{drag} ³².



Slika 32. Eksperimentalna validacija teorije o utjecaju sile akustične radijacije na polistirenskim mikročesticama u vodi pod utjecajem stojnog $\lambda/2$ vala u 1D³²

Na Slici 32. (a) može se vidjeti točnost eksperimentalnih podataka s teoretski određenim transverzalnim putem, $z(t)$, izračunatim prema jednadžbi:

$$z(t) = \frac{1}{k} \arctan \left\{ \tan[kz(0)] \exp \left[\frac{4\Phi}{3} (ka)^2 \frac{E_{ac}}{\eta} t \right] \right\} \quad (47)$$

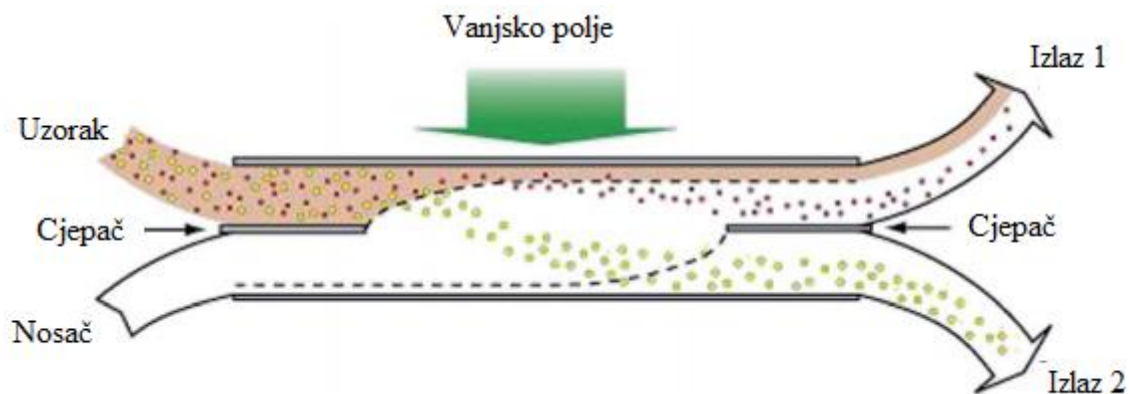
Na Slici 32. (b) nalaze se mjerenja transverzalne akustične brzine, $v_p(z)$, mjerene mikročestičnom velocimetrijom (PIV). Mjerenja se poklapaju s teorijski određenom brzinom (jed. 45). U mjerenjima jedini parametar koji se mijenjao bila je gustoća akustične energije E_{ac} , pri čemu su u mjerenjima određene srednje vrijednosti pri kojima se čestice ponašaju u skladu sa teorijskim pretpostavkama, a određene srednje vrijednosti odgovaraju gustoći akustične energije koja se teorijski pretpostavila kao potrebnom³².

Ekperimentalno se potvrdilo kako viskoznost igra veliku ulogu za čestice čija se gustoća znatno razlikuje od vode, ali skoro nikakvu kod čestica čiji je uzgon skoro pa neutralan. Što su čestice veće, treba im manje vremena da budu fokusirane u prostoru pod utjecajem UZV zračenja. U sustavima poput separacije krvnih stanica iz krvi ili sustavima u kojima se nalazi mnogo čestica, sustav je složeniji od prikazanog zbog međudjelovanja tih krvnih stanica, odnosno čestica³².

2.4. Izrada uređaja za akustofluidiku

2.4.1 Dizajn mikroreaktora

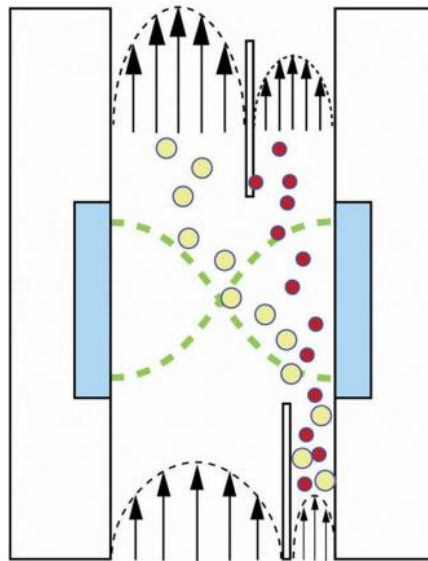
Akustoforeza se, pri kontinuiranom toku suspenzije, najčešće koristi za koncentriranje čestica koje se često naziva i akustično zarobljivanje. To se generalno čini fokusiranjem čestica u čvorove UZV valova pri čemu dolazi do razdvajanja toka u frakciju koja sadrži visoku koncentraciju čestica i u frakciju koja sadrži medij bez čestica u sebi. Slikoviti se prikaz nalazi na Slici 33.



Slika 33. Shematski prikaz razdiobe toka³³

Na gornjoj slici vidljiv je takozvani SPLITT dizajn u koji ulazi uzorak sastavljen od više različitih čestica. U frakcijskoj komori dolazi do utjecaja vanjskog polja, koje je uzrokovano UZV valovima, na čestice pri čemu je utjecaj veći i brži na veće čestice nego na manje stoga dolazi do razdvajanja većih čestica od onih manjih³³.

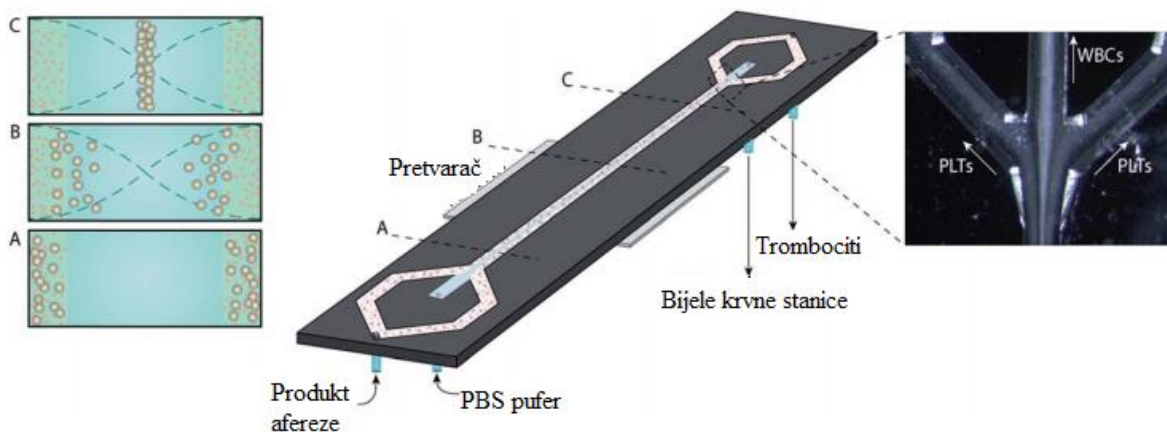
Prikaz $\lambda/2$ rezonatora za istoimenu separaciju nalazi se na Slici 34.



Slika 34. Shema poluvalnog rezonatora za razdvajanje čestica različitih veličina³³

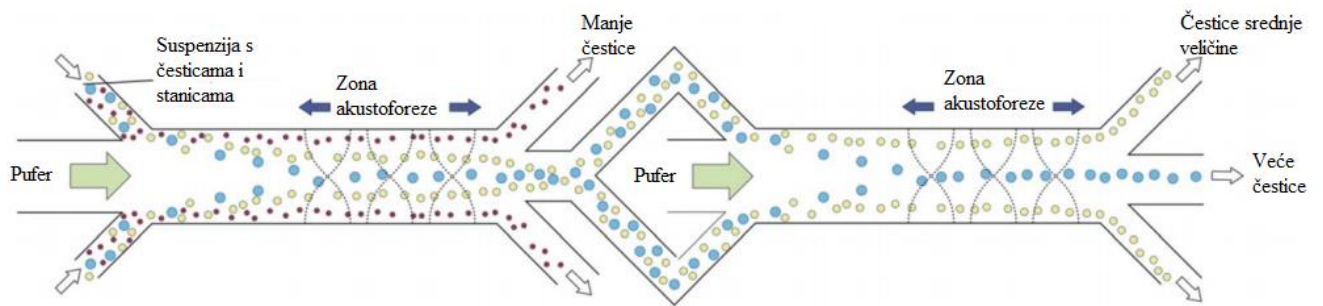
Istim principom uzorak koji sadrži više tipova čestica može biti razdvojen ako postoji više izlaza iz uređaja pri čemu je jedan od najbitnijih parametara sama veličina čestica s obzirom na to da se sila primarnog akustičnog zračenje povećava povećanjem čestice. Separacija u akustoforezi ovisi o jačini polja UZV valova i brzini protoka odnosno zadržavanja uzorka u separacijskoj komori. Valja napomenuti kako čestice ipak moraju imati određenu veličinu jer za čestice manje od mikrona dolazi do izraženijih efekata akustičkog toka jer je zbog male dimenzije čestica njihova sila primarnog akustičnog zračenje mala³³.

Na Slici 35. nalazi se sistem koji je eksperimentalno ispitivan za separaciju trombocita nakon afereze.



Slika 35. Shema sustava za searaciju trombocira iz produkta afereze (FFA)³³

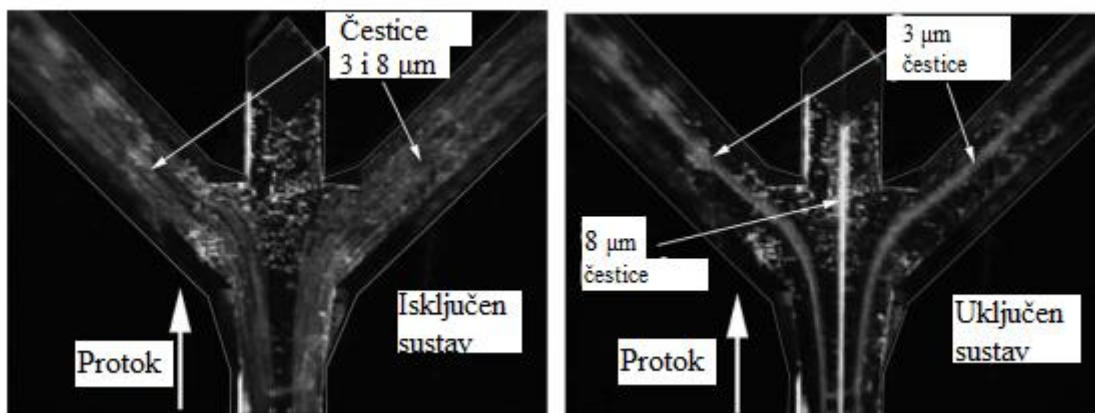
Uz SPLITT sustav valja spomenuti i višeizlazni sustav FFA koji je prikazan na Slici 36.



Slika 36. Shematski prikaz serijski spojenog dualnog FFA sustava³³

U FFA sustavu dolazi do miješanja pufera i uzorka u istom kanalu pri čemu je cilj separacija čestica. Separacija se odvija pod utjecajem akustoforeze gdje prvobitno dolazi do odvajanja najmanjih čestica. Ako je sustav dualni i spojen serijski, ponovno dolazi do razdvajanja manjih i većih čestica koje su preostale u sustavu nakon prve separacije. Ovakvo serijsko spajanje omogućuje separaciju uske raspodjele veličine čestice³³.

U praksi uspješan dizajn uređaja i separacija čestica izgleda poput onog na Slici 38.



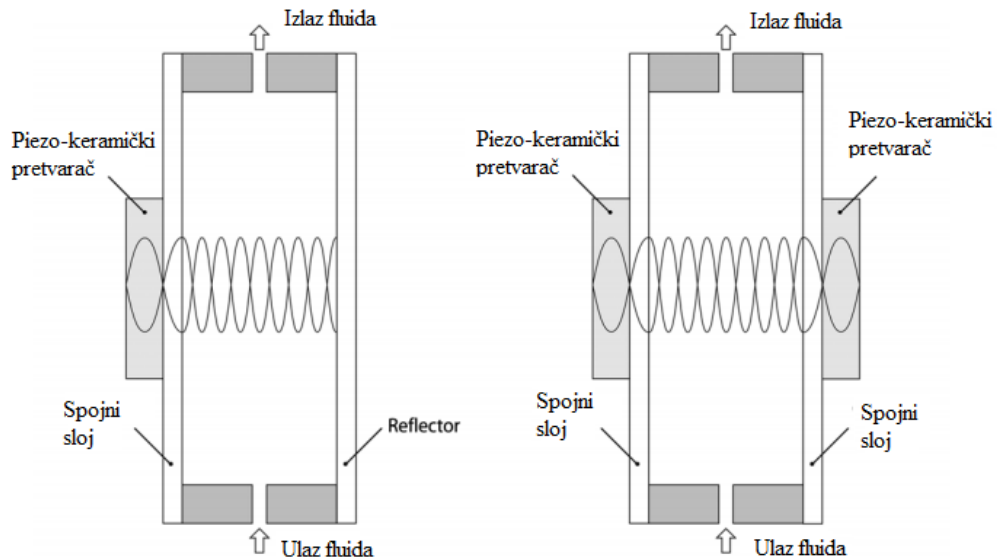
Slika 37. Uspješna separacija čestica 3 i 8 μm pod utjecajem akustoforeze³³

Trenutno su staklo i silikon najčešće korišteni materijali za izradu uređaja za akustoforezu, a izrađuju se metodom jetkanja³³.

2.4.2 Izrada rezonatora

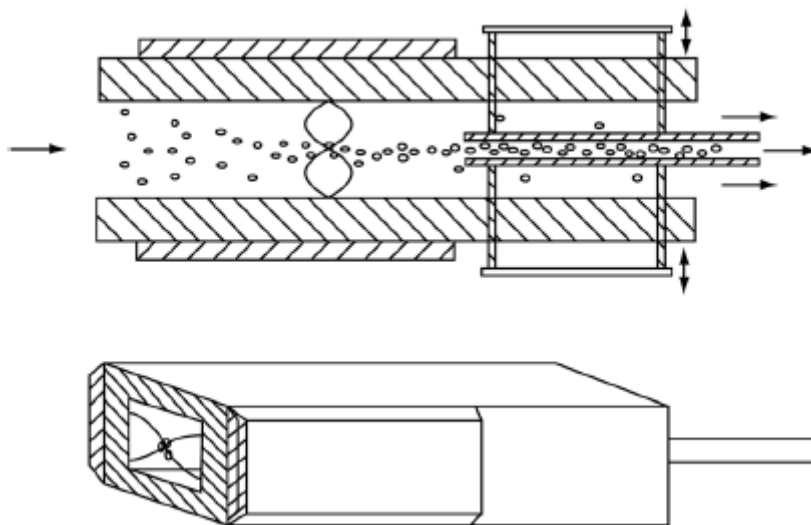
U dosadašnjem se tekstu mnogo puta spomenuo rezonator i pretvarač koji stvara UZV valove kroz sustav pri čemu dolazi do akustoforeze. Rezonatori za stvaranje UZV valova nisu nova tehnika jer se već dugi niz godina nalaze u mnogo različitih industrija stoga je njihova izrada dobro poznata i usavršena.

Pri izradi rezonatora za korištenje u sustavu malih čestica i stanica, rezonator se sastoji od piezokeramičkog pretvarača koji je zalijepljen na par slojeva stakla ili metala dok je suprotno njemu smješten pasivni reflektor te je takav rezonator nazvan slojevit rezonator (Slika 38.)³⁴.



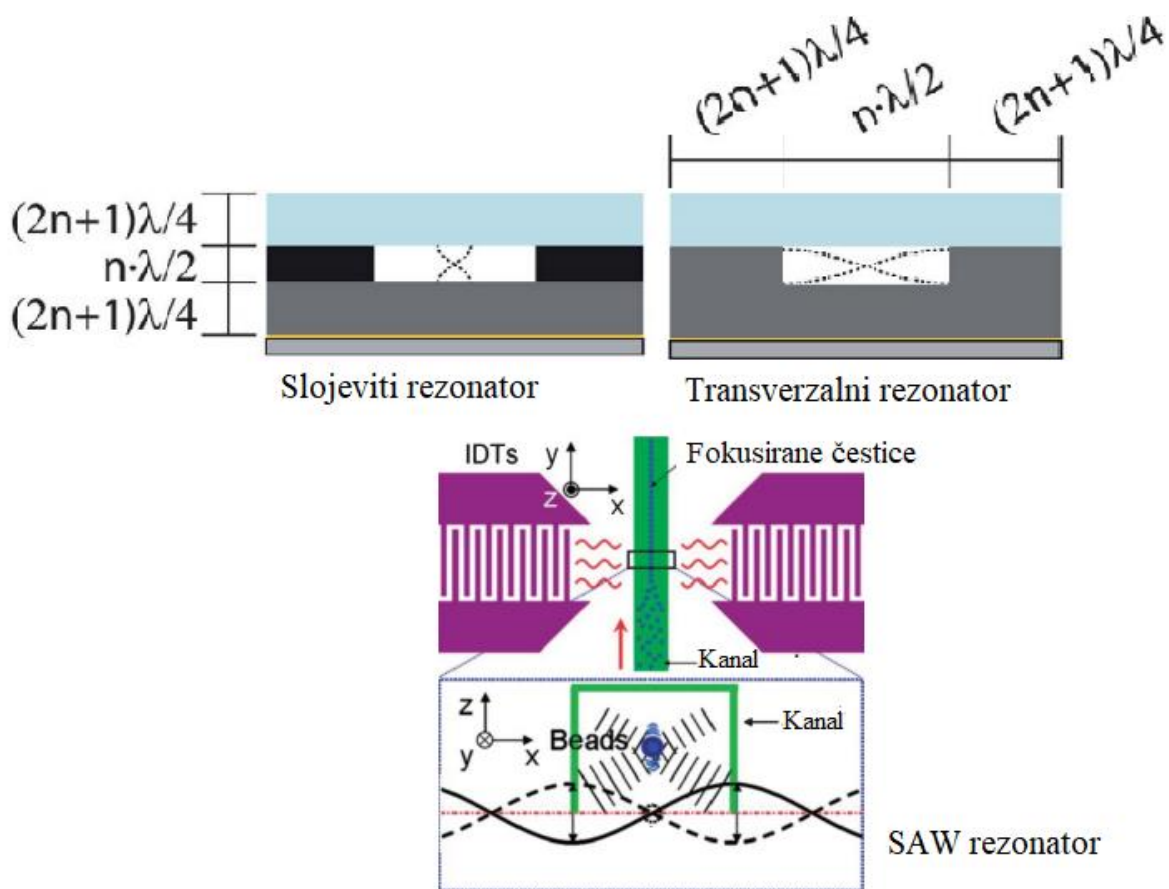
Slika 38. Shema slojevitog rezonatora s jednim pretvaračem i reflektorom te shema s 2 pretvarača³⁴

Razvojem poluvalnog rezonatora dimenzije rezonatora mogle su biti puno manje nego prije što je omogućilo njihovo korištenje u sustavima za akustofluidiku (Slika 39.).



Slika 39. Shema poluvalnog rezonatora za fokusiranje stanica i čestica³⁴

Prilikom izbora materijala za izradu rezonatora najveću ulogu ima tip rezonatora. U akustofluidici najčešće se koristi transversalni, slojeviti te SAW (*surface acoustic wave*) rezonator. Materijali se biraju s naglaskom na Q-vrijednost, bezdimenzijski parametar koji ukazuje na prigušenost rezonatora, pri čemu se odabire materijal i tip rezonatora koji će osigurati što veću vrijednost tog parametra. Slojeviti rezonator je kompleksan tip rezonatora jer debljina slojeva rezonatora utječe na Q-vrijednost, ali zbog principa rada slojevitog rezonatora gdje se glavna refleksija vala zbiva u sredini između pretvarača i reflektora moguće je koristiti materijale poput polimera koji inače smanjuju akustične valove. S druge strane, transversalni rezonator se oslanja na refleksiju o same stjenke kanala stoga je poželjno da materijal samih mikrokanala bude staklo ili silikon koji osiguravaju visoku akustičnu impedanciju dok debljina slojeva u samim rezonatorima nije od velike važnosti za visoku Q vrijednost. SAW rezonatori pak imaju drugi princip djelovanja i oslanjaju se na propagaciju valova kroz fluid uz prisustvo supstance za vođenje vala. Prilikom izrade SAW rezonatora bitno je birati materijal čija je akustična impedancija slična onoj fluida kako bi se izbjeglo stvaranje ometajućih rezonanci. Slika 40. prikazuje usporedno sva tri najčešće korištena tipa rezonatora.



Slika 40. Usporedba slojevitog, transversalnog i SAW rezonatora

Slojevi rezonatora moraju biti pažljivo birani kako bi njihova akustična impedancija bila usklađena te kako ne bi dolazilo do nepotrebne refleksije i kako bi gustoća akustične energije bila što veća. Pri dizajniranju rezonatora, od velike je važnosti i veličina čestica jer što su čestice manje zahtijevaju valove veće frekvencije kako bi se postigla ista sila akustične radijacije³⁴.

2.4.3 Biokompatibilnost uređaja

Jedna od glavnih primjena akustoforeze leži u separaciji stanica, stoga je bitno uzeti u obzir biokompatibilnost uređaja za akustoforezu odnosno proučiti ima li proces neke negativne posljedice na stanice.

UZV zračenje i stvaranje UZV valova proizvodi toplinu grijući svoju okolinu. To je nešto na što se u radu sa stanicama mora obratiti posebna pažnja. Ova metoda separacije često je korištena za razdvajanje krvnih stanica, a poznato je kako su stanice čovjeka stabilne u rasponu 34-37 °C, pri čemu se 37 °C smatra idealnim za kulture stanica³⁵.

Druga pojava koja se pokušava izbjeći je kavitacija odnosno stvaranje mjehurića zraka/plina pod visokim tlakom i temperaturom unutar fluida što je posljedica interakcije fluida i UZV valova. Pojava kavitacije može uzrokovati lokalne temperaturne maksimume, stres na stanice te puknućem oštetiti stanice koje se pokušavaju separirati³⁵.

Sila akustične radijacije, koja je osnova za uspješnu provedbu akustoforeze, se u rijetkim slučajevima smatrala uzročnikom oštećenja određenih tipova stanica (neurona životinja i crvenih krvnih stanica) međutim točna uzročno- posljedična veza nije nađena³⁵.

Akustično strujanje kao takvo je logična opasnost za oštećenje stanica jer fluidi u kretanju jednostavno samim kretanjem mogu uzrokovati oštećenje. Međutim, eksperimentalno se pokazalo kako je opasnost za stanice od samog protoka fluida mala³⁵.

2.5. Primjena akustoforeze

Akustoforeza nije široko rasprostranjena tehnika u industriji već se njena primjena razmatra u laboratorijskim istraživanjima i primarno u biotehnoške svrhe. Osim separacije čestica, proučava se utjecaj akustoforeze na studije populacije stanica, interakcije između različitih tipova stanica/ čestica te sam utjecaj UZV valova na ponašanje stanica. Također se proučava i pranje ili koncentriranje stanica, zaustavljanjem stanica u uređaju pod utjecajem protoka i UZV valova moguće je prati stanice dodavanjem pufera u kanal³⁶.

Akustoforeza se može kombinirati i s drugim silama poput gravitacijske, magnetne, hidrodinamičkih, električnih te optičkih pri čemu se razvijaju kombinirane tehnike koje se mogu upotrijebiti u različite svrhe³⁷.

Sposobnost manipulacije velikog broja čestica različitih veličina i tipova, relativna jednostavnost izrade, mogućnost kontinuirane i održive manipulacije česticama, mogućnost stvaranja akustičnih "zamki" u kojima se stanice zadržavaju te stvaranje sila koje ovise o veličini, gustoći i stlačivosti su velike prednosti akustoforeze zbog kojih ima velik potencijal samostalne ili kombinirane primjene³⁷.

2.5.1 Nedostaci

Svaka metoda u znanosti ima svoje prednosti i nedostatke pa tako i akustoforeza. Prvenstvena mana je ograničen broj materijala koji se može koristiti u svrhe izrade uređaja za akustoforezu pri čemu se posebna pažnja mora obratiti na gustoću, brzinu prolaza zvuka kroz materijal, akustičnu impedanciju materijala te koeficijent refleksije materijala.

U eksperimentima se predravnanje čestica akustičnim valom pokazalo potrebnim kako bi sve čestice ušle u proces akustoforeze iste brzine i istih pozicija. Uz predravnanje kao tehniku predobrade još je bitna i sama koncentracija uzorka pri čemu se ona po potrebi razrijedi¹⁵.

Još jedan nedostatak sustava je već spomenuta temperatura zbog čega se prilikom izrade uređaja za akustoforezu moraju ukomponirati temperaturni senzori i dijelovi za hlađenje sustava¹⁵.

Osim akustične impedancije materijala u obzir se mora uzeti i akustična impedancija fluida kako ne bi došlo do relokacije fluida što onemogućuje separaciju čestica iz njega¹⁵.

Naravno, s obzirom da se radi o veoma malim sustavima, vidljivost i vizualno praćenje sustava je moguće jedino uz mikroskope.

3. PREGLEDNI DIO

U nastavku će se obraditi tri zasebna eksperimentalna slučaja korištenja akustoforeze u medicinske svrhe. Akustoforeza se koristila za određivanje eritrocita u krvi³⁸, za detekciju bakterija u krvi u svrhu ranog otkrivanja sepse³⁹ te za koncentriranje stanica tumora iz krvi za daljnju analizu⁴⁰.

3.1. Određivanje postotka koncentracije eritrocita u krvi

U medicini od velike je važnosti odrediti hematokrit u krvi kako bi se pacijentu postavila ispravna dijagnoza. Tradicionalno, hematokrit se određuje mikrohematokritskom metodom odnosno ubrizgavanjem krvi u kapilaru koja se zatim centrifugira pri velikim brzinama kako bi se odredila relativna visina zbijenih stanica. U modernijim bolnicama i ustanovama koristi se analizator cijele krvi koji mjerenja vrši na osnovnu impedancije³⁸.

3.1.1 Materijali

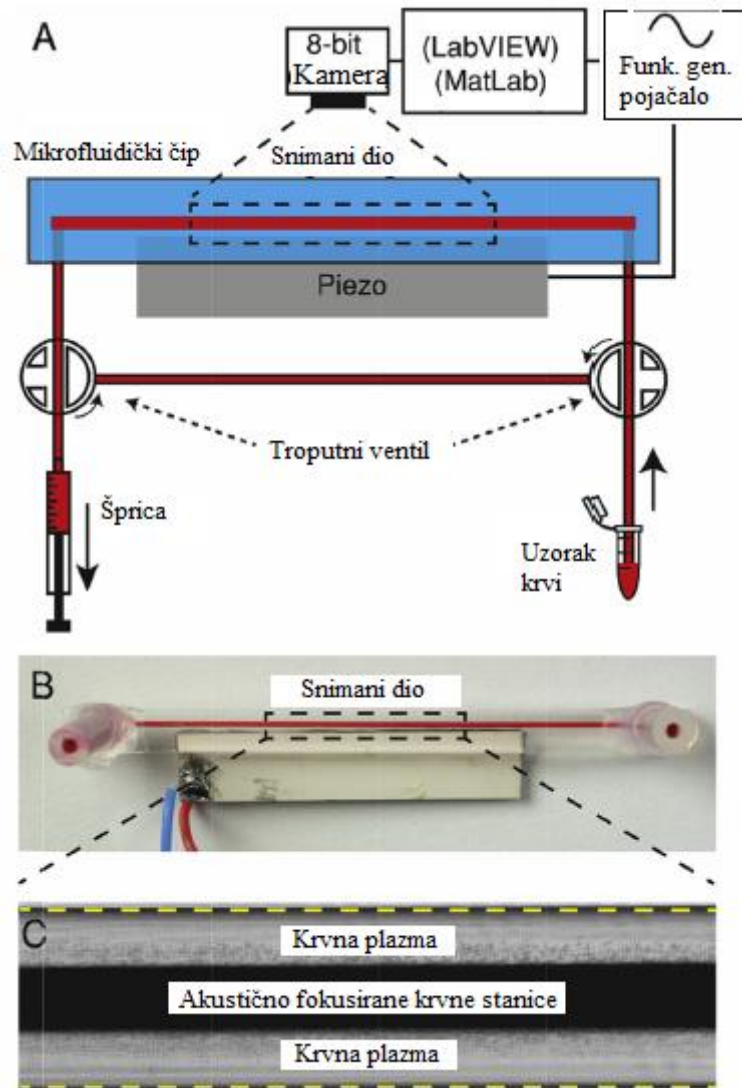
Mikrokanal je dizajniran od strane firme Micronit Microfluidics i izrađen fotolitografijom te mokrim jetkanjem u borosilikatnom staklu. Kanal je 400 μm širok, 150 μm dubok i nalazio se u čipu duljine 45 mm i 3 mm širine. Silikonske cijevi za dovod uzorka su spojene silikonskim ljepilom kao i piezokeramičan pretvarač koji se nalazi na čipu.

Krv upotrebljena u eksperimentu dobivena je od zdravih donora čija je doza krvi podijeljena u dva dijela. Jedan dio se centrifugirao kako bi se generirala krvna plazma koja se zatim miješala s originalnom krvi donora kako bi se dobile različite koncentracije krvi ispitivane u eksperimentu.

Kontrolna mjerenja hematokrita određena su na hematokritskoj centrifugi u skladu s općim metodama i protokolima korištenim u medicini³⁸.

3.1.2 Dizajn sustava

Na Slici 41. Prikazan je dizajn sustava korišten u eksperimentu



Slika 41. (A) Shema sustava (B) Slika sustava ispunjenog crvenom bojom kako bi se lakše vizualizirao kanal ispunjen krvlju (C) Slika sustava tijekom akustoforeze gdje je tamni dio sustava skup krvnih stanica, a svijetli dio je krvna plazma³⁸

Za sustav su korištene špricne pumpe (NeMESYS, Cetoni GMBH, Germany) pri protoku od 2 mL min⁻¹. Tok krvi i zaustavljanje krvi je regulirano troputnim ventilima, a sustav se ispirao 6 s 70% izopropanolom pri protoku od 2 mL min⁻¹ između svakog eksperimenta.

Signal UZV valova iz piezokeramičkog pretvarača pojačan je uz pojačalo signala (AR 75A250, Amplifier Research, Souderton, PA, USA) i generiran uz funkcijski generator (Tectronix AFG3022B). Aktivirajući signali bili su sinusoidini 1,8 do 2,1 MHz, s ciklusom od 1 ms i amplitudom od 15 V. Za promatranje i fotografiranje sustava korišten je mikroskop (DM2500

M, Leica Microsystems CMS GmbH, Germany) s 8-bitnom CCD kamerom u sivim tonovima (EoSens mini MC-1370, Mikrotron GmbH, Unterschleissheim, Germany). Analiza fotografija vršena je analitičkim algoritmom u Matlabu³⁸.

3.1.3 Metoda

U navedenom uređaju za akustofluidiku separirale su se krvne stanice od plazme. Do separacije je došlo u mikrofluidnom kanalu u kojem je djelovao poluvalni, akustični, stojni val preko širine kanala. Krv se ubrizgala u sustav te je protok nakratko zaustavljen koristeći troputne ventile pri čemu se aktivirala ultrazvučna propagacija vala i snimanje sustava. Obrada fotografija sustava u logaritmu sustava Matlab je dala povratnu informaciju o procjeni hematokrita. Kako bi se pokazala linearnost metode, napravljen je baždarni dijagram s uzorcima krvi već poznate, različite koncentracije hematokrita³⁸.

3.2. Detekcija bakterija u krvi u svrhu ranog otkrivanja sepse

Sepsa je sistemski upalni proces koji se javlja kao odgovor tijela na infekciju koja je najčešće uzrokovana bakterijama. Smrtnost u ljudi koji obole od sepse je 30% pri čemu adekvatni odabir antibiotika u ranoj fazi sepse značajno smanjuje smrtnost. Svaki sat odgode adekvatnog tretmana je povezan s 7,6 % smanjenja stope preživljavanja tijekom prvih 6 sati u pacijenata u septičkom šoku. Ipak, najčešće, detekcija i identifikacija patogena iz uzorka krvi traje između 29 i 130 h po standardnim metodama koje se trenutno koriste³⁹.

3.2.1 Materijali

U sustavu je korišten silikonski čip za akustoforezu i jednokratni PCR čip, dijelovi sustava su bili spojeni cijevima od teflona pri čemu su se električni ventili (Cheminert C2, Valco Instruments Company Inc., Houston, TX, USA) koristili za propuštanje tekućina tijekom pripremanja uzorka. Uzorci i puferi su se ubrizgavali u sustav uz pomoć špricnih pumpi (neMESYS, Cetoni GmbH, Korbussen, Germany). Staklene šprice su se koristile za otpadne struje iz sustava dok su se svi puferi i uzorci ubrizgavali plastičnim, sterilnim špricama kako ne bi došlo do kontaminacije.

Mikrokanal u silikonskom čipu za akustoforezu napravljen je fotolitografijom te mokrim jetkanjem pri čemu je stakleni poklopac za kanal zatvoren anodnim spajanjem. Piezoelektrični pretvarač (2 MHz, PZT26, Ferroperm piezoceramics, Denmark) zalijepljen je s donje strane mikrokanala skupa s pojačalom (75A250A Amplifier Research, Souderton, PA, USA) i osciloskopom (TDS 1002, Tektronix UK Ltd., Bracknell, UK) za praćenje voltaže u pretvaraču.

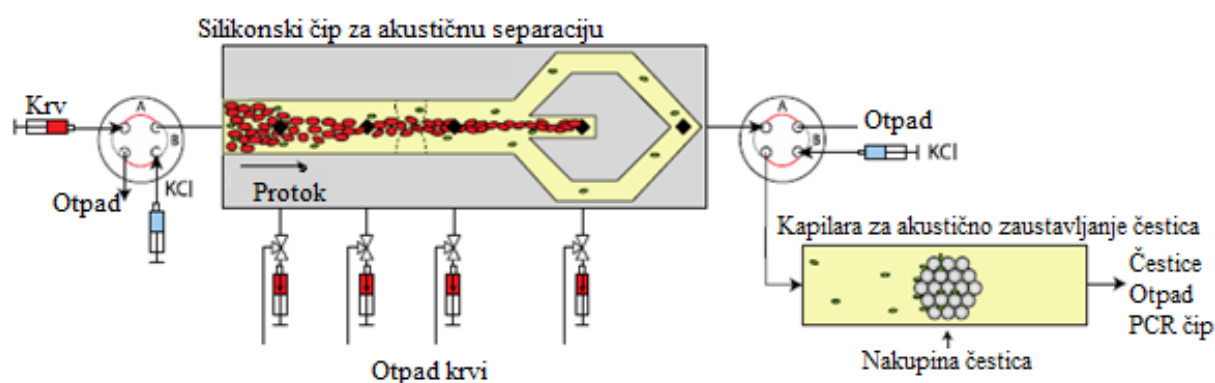
Element za čip je izrađen od aluminijske i PMMA te je korišten za spajanje mikrocijevnih komponenti, Peltierovog elementa i ventilatora.

Separacija bakterija vršena je u borsilikatnoj staklenoj kapilari poprečnog presjeka $0,2 \times 2 \text{ mm}^2$ (Vitrotube 3520, Vitrocom, Mountain Lakes, NJ, USA) koja je pričvršćena plastičnim držačem. Kapilara je prvobitno ispunjena kuglicama polistirena (Fluka Chemie AG, Switzerland) promjera $12 \text{ }\mu\text{m}$.

Cijeli sustav je kontroliran računalnim programom stvorenim u laboratoriju baš za navedeni sustav³⁹.

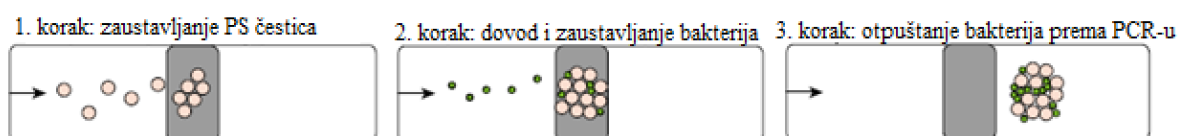
3.2.2 Dizajn sustava

Na Slici 42. vidljiv je dizajn sustava korištenog u eksperimentu.



Slika 42. Dizajn sustava korištenog u svrhu separacije bakterija iz krvi³⁹

Sustav je dizajniran tako da krv prvo prolazi kroz silikonski čip gdje se pod UZV valova razdvajaju crvene krvne stanice i bakterije. Odvojena plazma koja sadrži bakterije se uvodi u kapilaru gdje se uz pomoć UZV valova i polistiren kuglica bakterije zarobe i izdvoje iz sustava.



Slika 43. Shema postupka izdvajanja bakterija³⁹

Na Slici 43. Vidljiva je shema zarobljivanja bakterija kroz tri koraka. U prvom koraku dolazi do zarobljivanja polistiren kuglica u stojnom valu, u drugom koraku protok plazme s bakterijama dolazi do UZV valova koji zaustavljaju bakterije pri čemu one zaostanu između

polistiren čestica. Nakon protoka cijelog uzorka, UZV valovi se gase i nakupina polistiren čestica i bakterija napuštaju kapilaru i odlaze u PCR čip sa suhim reagensom³⁹.

3.2.3 Metoda

Uzorak krvi ubrizgava se u sustav (Slika 43.) gdje dolazi do separacije crvenih krvnih stanica uslijed djelovanja UZV valova. Preostala plazma i bakterije ulaze u kapilaru gdje se UZV valovima zadržavaju polistirenske kuglice veličine 12 μm . Ulaskom u područje UZV vala bakterije se u njemu zadržavaju i samom interakcijom s polistirenskim kuglicama bivaju na njima zadržane. Točan broj polistirenskih kuglica ovisi o uvjetima sedimentacije, a prema dosadašnjim podacima mala razlika u promjerima kuglica ne utječe na efikasnost sustava. Čipovi su održavani na temperaturi od 28 °C. Nakon prolaska uzorka kroz sustav, pretvarači UZV valova su isključeni te je nakupina polistirenskih kuglica i bakterija usmjerena u PCR čip sa suhi reagensom koji je zatim išao na daljnju analizu kako bi se bakterije identificirale.

Uspješnost odvajanja crvenih krvnih stanica iz uzorka i neoštećenost bakterija testirani su zasebno. Za testiranje sustava je uzgojena bakterija *E.coli* kroz 2,5 h na temperaturi 37 °C bez IPTG-a, a zatim na 30 °C tokom 16 h s IPTG-om. Kultura je potom centrifugirana i suspendirana u izotoničnoj fiziološkoj otopini.

Cijela se krv skupljala u standardizirane epruvete pri čemu su krvne stanice isprane centrifugiranjem. Krvne stanice su potom resuspendirane u istom volumenu izotonične fiziološke otopine koja je sadržavala: albumin govedeg seruma (0,1 g / L), metil α -D-manopiranozid (25 g / L) i *E. coli* (konačna koncentracija 3×10^8 bakterija / ml).

Uzorak je ubrizgan u sustav protokom 80 μL / min pri čemu su crvene krvne stanice uklonjene kroz 4 izlaza iz sustava s protokom od 20, 20, 15, 15 μL / min koji je osiguran pomoću špricnih pumpi. U sustavu je zaostala plazma s bakterijama koja je sakupljena pri izlasku iz sustava. Koncentracija crvenih krvnih stanica i bakterija po izlasku iz sustava je određena i uspoređena s početnom uz pomoć protočne citometrije.

Testiranje uspješnosti zadržavanja i samim time nakupljanja bakterija u kapilari provedeno je suspendiranjem *E. coli* ($22,2 \times 10^6$ bakterija / ml) u izotoničnoj fiziološkoj otopini (9 g / L). Suspenzija bakterija perfundirana je pri 10 μL / min preko nakupine polistirenskih čestica promjera 12 μm koje su se nalazile u akustičnoj zamci koju je uzrokovao UZV val od 4 MHz.

Također, proveden je test ispravnosti PCR čipa. *Pseudomonas* spp. čip testiran je u stvarnom vremenu (testiranje u stvarnom vremenu je testiranje ispravnosti računalnog programa u svrhu

u koju se koristi) koristeći se s 10, 100, 1000, 10 000 *P.putida* bakterija u 35 µL, 100 mM KCl. *S. aureus*, *S. pneumonia* i *E.coli* PCR ispitivanja su provedena u prethodnim istraživanjima pri čemu je limit detekcije bio 3, 2 i 400 CFU. Specifičnost PCR testova je verificirana koristeći se 21-om vrstom bakterija koje uzrokuju sepsu.

Protokol sterilizacije sustava bio je standardan pri čemu se KCl otopina (100 mM) iz kapilare uzrokovala (35 µL) i testirala na prisutnost *P.putide* i uspoređivala sa sterilnom KCl otopinom.

Učinjeno je i testiranje sustava s citriranom krvi u koju je dodana poznata količina bakterije *P.putide* i sterilnog izotoničnog NaCl-a pri čemu je koncentracija citrirane krvi odgovarala 63 % one cijele krvi. Dodan je i natrijev azid kako bi se spriječio daljnji rast bakterija. 1,43 ml svakog uzorka krvi (što odgovara 1 ml pune citrirane krvi) obrađeno je u sustavu pri čemu su izdvojene bakterije puštene u PCR čip za detekciju *Pseudomonas* spp. u PCR instrumentu. Test je ponovljen s trostrukim uzorcima za 10, 100, 1 000 i 10 000 bakterija / ml citrirane krvi i sedam kontrola koje nisu imale bakterije u sebi.

Nakon svih testiranja u svrhu određivanja limita, karakteristika i točnosti sustava, kroz 2 mjeseca skupljala se krv volontera koji su dobrovoljno dali uzorke krvi za istraživanje. 71 volonter je dao krv za potrebe testiranja, pri čemu je uvjet za sudjelovanje u istraživanju bilo da pacijent ima simptome neutropenične temperature, da se sumnja na sepsu uslijed infekcije urinarnog trakta ili upale pluća ili da ima već razvijenu sepsu (prema ACCP/SCCM konsenzusu). Uzorci krvi uzeti su standardnom procedurom od pacijenata te su ubrizgani u ispitivani sustav i testirani PCR testovima za *E.coli*, *S. aureus* i *S. pneumonia* koje su odabrane jer su najčešći uzročnici sepse po podacima klinika iz koje su uzorci krvi uzeti³⁹.

3.3 Koncentriranje stanica tumora iz krvi

Uspješnost liječenja raka povećava se ranim otkrivanjem same bolesti dok se 90 % smrti uzrokovane rakom smatra posljedicom metastaza. Cirkulirajuće tumorske stanice (*Circulating tumor cells*, CTC) su definirane kao tumorske stanice koje se može naći u perifernoj krvi pacijenta. Dosadašnja istraživanja pokazuje kako samo mali dio CTC-a uzrokuje daljnje stvaranje i metastaziranje raka, ali istraživanja pokazuju kako postoji poveznica između razine CTC-a u krvi sa stopom preživljavanja malignih bolesti. Povišene razine CTC-a su češće u pacijenata s epitelnim karcinomom poput onog dojke, prostate i kolorektalnog koji su već metastazirali. Uz druge dijagnostičke pretrage koji ukazuju na nastanak metastaza, povišene razine CTC-a se mogu iskoristiti kao uzorci "tekuće biopsije"⁴⁰.

3.3.1 Materijali

Stanice raka prostate dobivene su od strane *American Type Culture Collection* (ATCC), neprofitne, globalne organizacije koja se bavi sakupljanjem, skladištenjem i distribucijom mikroorganizama, stanica i drugih materijala koji se upotrebljavaju u znanstvene svrhe te su po njihovim smjernicama uzgojene. Svim medijima dodano je 10 % fetalnog, goveđeg seruma (Sigma-Aldrich), 55 IU/mL penicilina i 55 µg/mL streptomicina (Sigma-Aldrich). Stanice su uzgojene na 37 °C u ovlaženoj atmosferi s 5 % CO₂. Krv je uzeta od zdravih volontera u Sveučilišnoj bolnici u Lundu u vakum epruvetama s EDTA kao antikoagulansom.

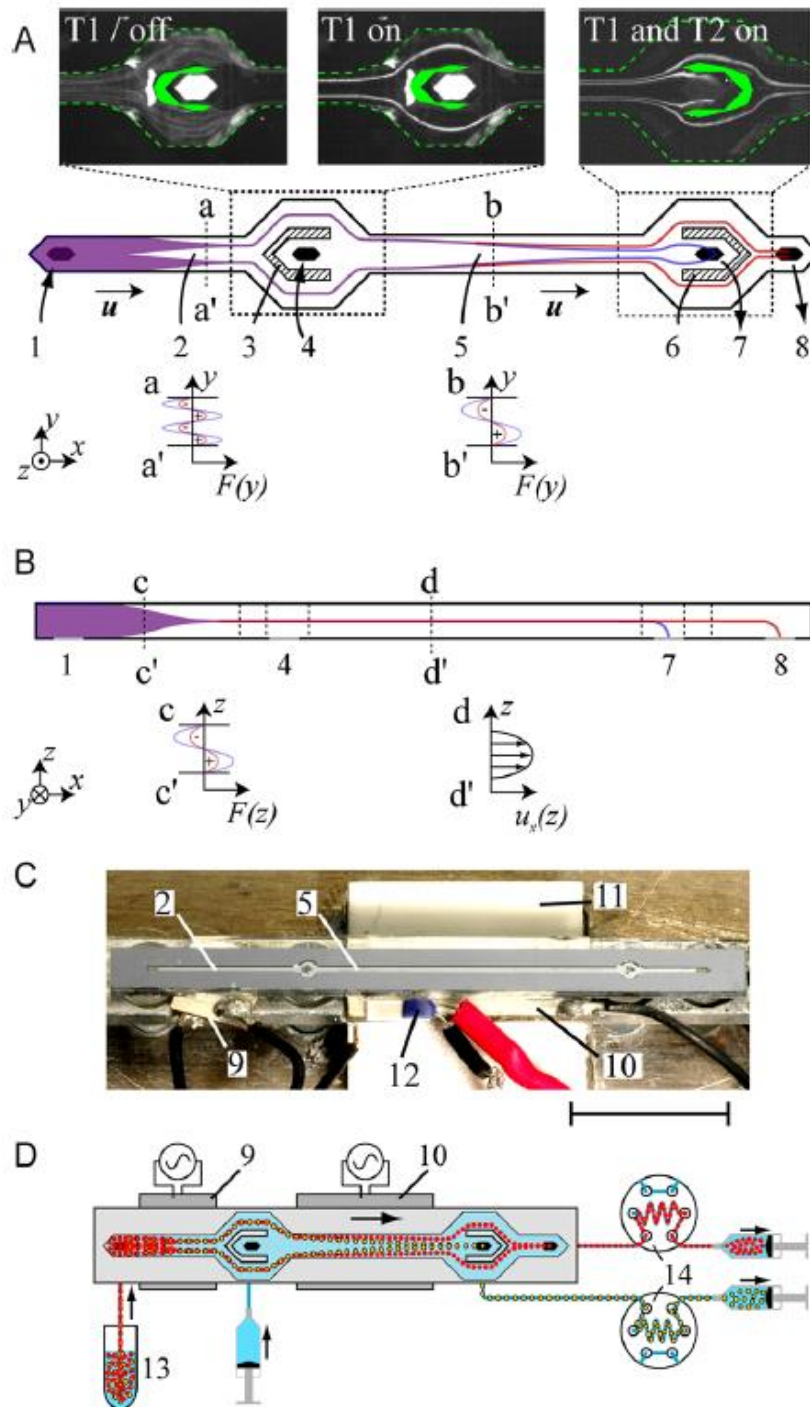
U sustavu su upotrebljene polistirenske čestice promjera 5 i 7 µm (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) suspendirane u Triton X-100 (0,01 %) u PBS-u.

Mikrokanal je izrađen jetkanjem u silikonskom materijalu (76 mm × 350 µm) standardnom KOH litografijom. U sustavu su se nalazila 2 piezokeramička pretvarača, jedan (PZT26, 5mm × 5 mm) zalijepljen s donje strane čipa ispod kanala za predravnanje na rezonanciji 5 MHz, a drugi (PZT26, 15mm × 5 mm) zalijepljen s donje strane ćelije za separaciju. Pretvarači su spojeni s funkcijskim generatorima (Agilent 33120A, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), pojačalima (LT1012, Linear Technology Corp., Milpitas, CA, USA) i osciloskopom (TDS 1002, Tektronix UK Ltd., Bracknell, UK). Temperatura u sustavu regulirana je Peltierovim elementom i otpornim termometrom PT100 koji su bili zalijepljeni ispod čipa.

U sustavu su se nalazile tri 10 mL staklene šprice (1010 TLL, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland) spojene na dvije špricne pumpe (WPI sp260p, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL). Treća šprica bila je spojena na špricnu pumpu (neMESYS, Cetoni GmbH, Germany) i uvodila je čisti pufer kroz centralni ulazni otvor. Dvije petlje, veličine 100 µL su serijski bile spojene na izlaze iz sustava kako bi se odredila uspješnost separacije sustava⁴⁰.

3.3.2 Dizajn sustava

Na Slici 44. nalazi se dizajn sustava u kojem je provođen eksperiment.



Slika 44. (A) Shema sustava iz gornje perspektive, (B) Shema sustava sa strane, (C) Fotografija koja pokazuje pozivije piezoelektričnih pretvornika i (D) Shema fluidne konfiguracije i akustofluidike⁴⁰

Na gornjoj slici vidljiva je shema sustava koja se sastoji od ulata za staničnu suspenziju (1), kanala za predravnanje (2), fluidnog razdvajaača v-oblika (3) koji razdvaja tok u obje strane centralnog fluidnog ulaza (4), kanal za separaciju stanice (5) ($20 \text{ mm} \times 375 \text{ }\mu\text{m} \times 150 \text{ }\mu\text{m}$), trifurkacijski izlaz (6) koji ima jedan centralni izlaz (7) i zajednički izlaz za obje strane (8). Piezokeramički pretvarači su označeni s (9), (10), dok su Peltierov element i PT100 označeni s (11) odnosno (12).

Sustav je s gornje strane zatvoren Pyrex staklom ($40 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 1.1 \text{ mm}$) koje je anodno povezano s doljnjim dijelom čipa⁴⁰.

3.3.3 Metoda

Alikvot od $100 \text{ }\mu\text{L}$ cijele krvi je inkubiran s antitijelima CD45-APC koja su spojena s fluorokromom ili s kontrolnim IgG-APC (BD Bioscience, San Jose, CA) pri sobnoj temperaturi kroz 20 minuta, zatim s BD FACS otopinom za liziranje 15 minuta te s 2% PFA kroz 10 minuta. Supernatant s liziranim eritrocitima odbačen je nakon centrifugiranja na 500 g te pranja s FACS puferom dva puta. Stanice raka prostate bile su izdvojene s tripsin/EDTA obradom te zatim oprane s FACS puferom dva puta. Stanice su zatim resuspendirane u FACS puferu koji sadrži antitijela EpCAM-PE spojena s fluorokromom ili kontrolom koja sadrži IgG-APC antitijela te inkubirane na sobnoj temperaturi 25 minuta. Za eksperimente u kojima stanice (DU145) nisu bile fiksirane na PFA, dodan je 7-AAD tijekom 20 minuta. Stanice raka zatim su podvrgnute liziranju, kako je opisano već, te su se isprale dva puta puferom. Krvi s liziranim eritrocitima u PBS-u dodane su stanice DU145 ($2,5 \times 10^5 \text{ mL}$).

Tijekom eksperimenta, pumpe su održavale protok u centralnom kanalu i onima sa strane na $280 \text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ odnosno $560 \text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ u kanalu za separaciju. Treća pumpa upumpavala je čisti pufer u centralni ulaz protokom od $490 \text{ }\mu\text{L}/\text{min}$. Suspenzija krvnih stanica odvodila se iz sustava na dnu kanala pri protoku od $70 \text{ }\mu\text{L}/\text{min}$. Dvije dvosmjerne petlje volumena $100 \text{ }\mu\text{L}$ spojene su na izlazima iz sustava kako bi se istraživala kvaliteta separacije. Separacija pod utjecajem akustoforeze odvijala se uz pomoć UZV pretvarača za predravnanje ($4,97 \text{ MHz}$, $8,5 \text{ V}_{pp}$) i UZV pretvarača za separaciju ($1,94 \text{ MHz}$) pri čemu se prilikom uključivanja UZV pretvarača automatski palila i petlja za hlađenje sustava. Prilikom unosa uzorka u sustav, čekalo se 15 s kako bi se protok ustabilio prije uključivanja petlji za sakupljanje uzoraka pri čemu se tijekom svakog eksperimenta uzelo barem tri uzorka iz svake petlje kako bi se mogle analizirati.

Nakon odvajanja krvnih stanica akustoforezom, fluorescentno označene stanice u centralnim i sporednim izlaznim frakcijama su izbrojane uz pomoć protočne citometrije. Leukociti su

karakterizirani kao CD45 pozitivni i EpCAM-negativni dok su tumorske stanice bile karakterizirane kao CD45 negativne i EpCAM-pozitivne. Flouescencija je kvantificirana citometrom i računalnim programom (FACSDiva). U eksperimentima s održivim stanicama, DU145 stanice nisu upotrebene ukoliko su bile 7-AAD pozitivne (odnosno mrtve) ili ako su bile unutar određenih prednjih/ bočnih regija raspršenja u računalnom programu.

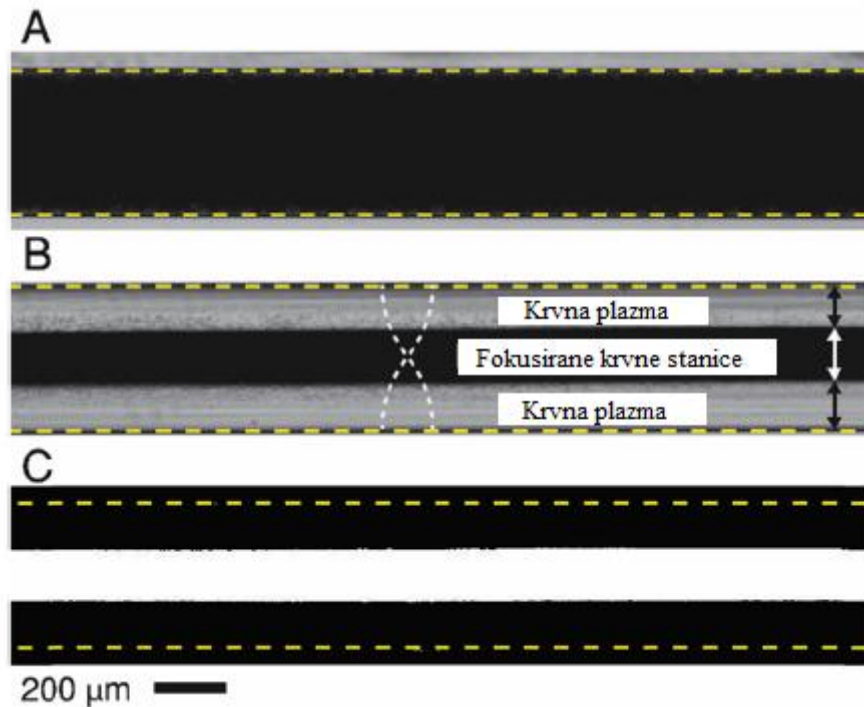
Stanice korištene u ovom pokusu (DU145, LNCaP i PC3) su bile odvojene tipsin/EDTA obradom i prane dva puta u PBS-u te resuspendirane u 1 % BSA/PBS. Stanice su u procesu akustoforeze prošle kroz mikrofluidni čip za akustoforezu kroz centralne i bočne ulaze i izlaze pri čemu je protok u centralnom izlazu bio 100 μ L/min te je suspenzija stanica povučena u centralni kanal istim protokom. Stanice su izložene UZV valovima 2 MHz s amplitudama od 10 ili 20 V_{pp}. Stanice su propuštene sustavom i bez utjecaja UZV kako bi se promatrao samo efekt mikrofluidnog sustava. Neprocesirane stanice su bile kontrolna grupa. Prilikom izvođenja eksperimenta, temperatura je održavana na 37 °C, a postotak održivih stanica se određivao Trypan-blue testom i brojanjem u Bürkerovoj ćeliji. Održivost stanica se mjerila nakon 24 i 48 h standardnom XXT metodom. Kako bi se odredio utjecaj akustoforeze na dugoročnu proliferaciju, DU145 stanice su brojane i uzgojene u posuđu za uzgoj kultura i nakon 60 h su izvađene i prebrojane (3 puta je ponovljen ovaj postupak, svaki put su ponovno uzgojene kulture koje su bile izvađene i prebrojane). Smrt stanica DU145 nakon inkubacije s RBC puferom za liziranje određena je protočnom citometrijom. Stanice su sakupljene tipsin/EDTA, inkubirane 15 min na sobnoj temperaturi sa 1 x BD Pharm Lyse, oprane PBS-om i zatim obojene 7-AAD tijekom 20 min u tamnom okruženju. 7-AAD pozitivne stanice su definirane kao mrtve⁴⁰.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Rezultati određivanja hemokrita

Eksperimenti su provedeni prema prethodno navedenom postupku (3.1.).

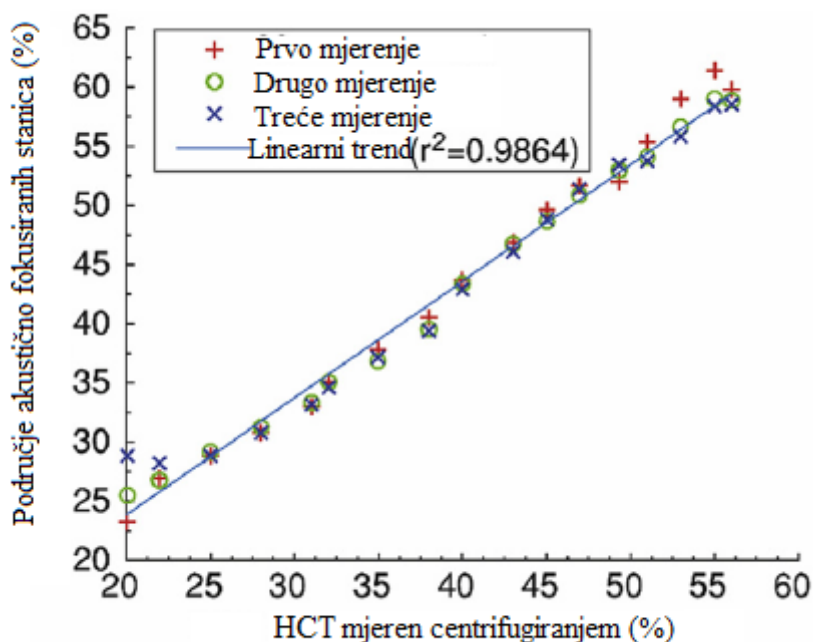
Na Slici 45. nalazi se fotografija sustava tijekom provođenja eksperimenta.



Slika 45. Fotografija sustava kada cijela krv ispunjava sustav (A), nakon utjecaja UZV valova na cijelu krv tijekom 20 s (B) te procesirana fotografija korištena za mjerenje hemokrita pri čemu žute linije prikazuju stijenke mikrokanala³⁸

Za provjeru linearnosti metode, napravljena je serija razrijeđenja krvi s postotkom hematokritom od 20 do 60 % s korakom od 2,5 %. Svaki od 17 uzoraka je mjeran tri puta i za svaki je napravljena kontrola sa standardnom tehnikom centrifugiranja. Rezultati su pokazali kako je metoda linearna s regresijom $y = 0,986x + 4,12$ s vrijednošću $R^2 = 0,987$, odnosno kako je HCT vrijednost mjerena akustičnom metodom proporcionalna HCT vrijednosti mjerenoj standardnom metodom centrifugiranja. Ono što se pokazalo je da obradom fotografija, računalni program može precijeniti količinu HCT-a na mjestima s manjim intenzitetom svjetla što se pokazalo utjecajnim za uzorke s HCT-om manjim od 25 %. Postoji mogućnost smanjenja takve greške s fotografiranjem u boji. Za uzorke s višim postotkom HCT-a, manja je šansa za ovakve greške. Za HCT vrijednosti veće od raspona mjenog ovim pokusima, smatra se da bi

postali nelinearni u odnosu na mjerenja centrifugiranjem zbog izometrijske geometrije kanala. Navedeni rezultati su prikazani na Slici 46. te u Tablici 3.



Slika 46. Prikaz mjerenja područja akustično zaustavljenih stanica u odnosu na HCT mjereno centrifugiranjem³⁸

Tablica 3. Linearni regresijski parametri i R^2 vrijednosti za područje akustično zaustavljenih stanica pri različitim vremenima³⁸

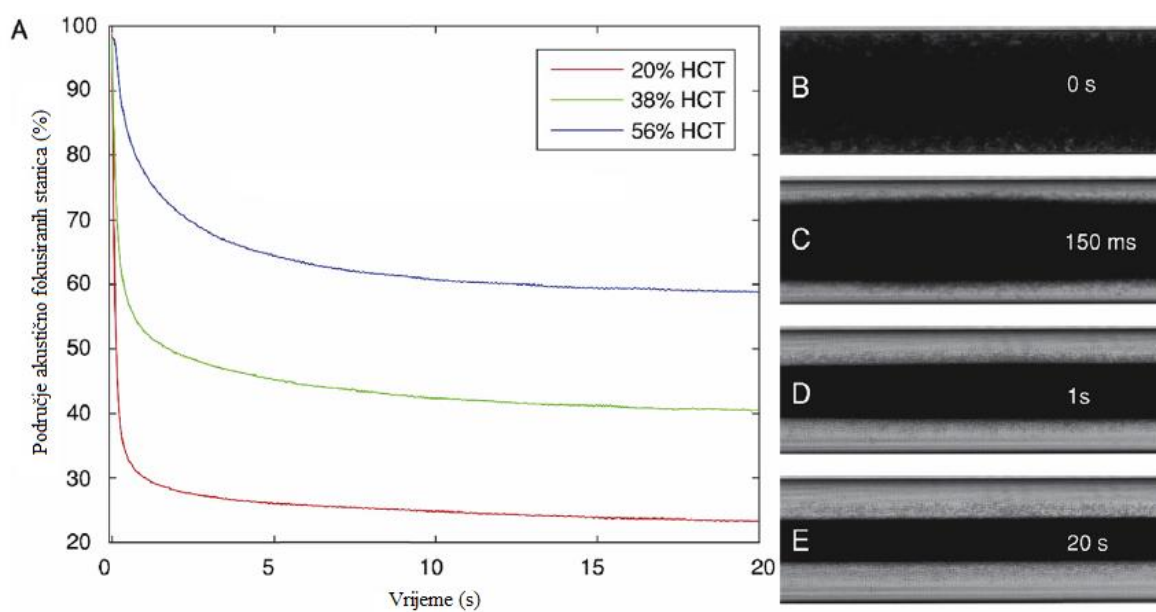
Ime serije	Boja	Linearna jednadžba	R^2 vrijednost
20 s	Crvena	$y = 0,9867x + 0,0412$	0,9861
5 s	Zelena	$y = 1,0544x + 0,369$	0,9884
2 s	Plava	$y = 1,1899x + 0,0253$	0,9887

Kako bi se dokazalo načelo ovih metoda, uzeta je krv jednog muškarca (Y1) i četiri žene (X1-4), svi su bili zdravi donori. Sva mjerenja ponovljena su tri puta, greška za uzorake bila je manja od 1 % osim u slučaju uzorka X3 gdje je greška bila 2,24 %. Standardna devijacija je bila manja

od 1 % za sve uzorke dok je apsolutna greška u sustavu bila 1,13 % te prosječna pogreška 0,95 %. Rezultati vidljivi u Tablici 4. te na Slici 47.

Tablica 4. Evaluacija akustične metode mjerenja HCT-a nakon 20 s. Pogreška je razlika HTC vrijednosti mjerene akustičnom metodom i referentne metode³⁸

Uzorak	HCT akustično (%)	HCT referentno (%)	Pogreška
X1	42,7 ± 1pp	43 ± 0,5pp	-0,27
X2	41,3 ± 1pp	42 ± 0,5pp	-0,68
X3	40,8 ± 0,7pp	43 ± 0,5pp	-2,24
X4	43,1 ± 1pp	44 ± 0,5pp	-0,90
Y1	47,7 ± 0,7pp	48 ± 0,5pp	-0,64



Slika 47. Ovisnost područja akustično fokusiranih stanica za krv s različitim vrijednostima HCT-a. Na fotografijama A-E se nalazi krv nakon 0 s, 150 ms, 1 s i 20 s izloženosti UZV valovima³⁸

Istraživanje je pokazalo da kako mjerenje HCT-a može biti odrađeno već nakon 2 s izlaganja uzorka UZV valovima. Mjerenja HCT-a nakon 2 s i 5 s su pokazala linearnu korelaciju s referentnim mjerenjima HCT-a isto kao i mjerenja na HCT-a nakon 20 s izlaganja UZV valovima. Ono što se pokazalo je da su mjerenja u ranoj fazi izlaganja UZV valovima (2 s i 5 s) osjetljivija na promjene u sustavu poput devijacija u akustičnoj energiji i tempiranja uzimanja

uzorka. Mjerenje u kraćem vremenu, zbog navedenih osjetljivosti, ima grešku od 1 % u odnosu na mjerenja učinjena nakon 20 s djelovanja UZV valova na uzorak. Rezultati su vidljivi u Tablici 5.

Tablica 5. Izmjerene HCT vrijednosti akustičnom metodom nakon 2 s i 5 s izlaganja krvi petero zdravih donora UZV valovima³⁸

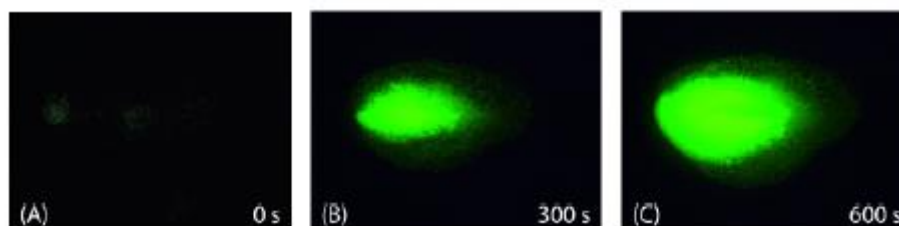
Uzorak	HCT referentni (%)	HCT (akustično) (%) 5 s	Pogreška (pp)	HCT (akustično) (%) 2 s	Pogreška (pp)
X1	43 ± 0,5pp	44,5 ± 1,8pp	1,5	45,1 ± 2,06pp	2,1
X2	42 ± 0,5pp	42,3 ± 1,7pp	0,3	42,7 ± 1,98pp	0,7
X3	43 ± 0,5pp	41,8 ± 0,8pp	-1,2	42,5 ± 1,41pp	-0,5
X4	44 ± 0,5pp	44,7 ± 1,4pp	0,7	45,1 ± 1,16pp	1,1
Y1	48,3 ± 0,5pp	49,6 ± 1,11pp	1,3	49,7 ± 1,08pp	1,4

Akustofluidni sustav kakav je promatran u ovom radu uspješno određuje HCT 200 µL uzorka cijele krvi u 20 s s pogreškom manjom od 1 %, odnosno kroz 2 s s pogreškom manjom od 3 %. Ovakav sustav, odnosno čip, ima potencijal ukomponirati se u složene analize ili kao samostalan prijenosni uređaj. Valja uzeti u obzir daljna istraživanja kako bi se smislila rješenja bez potrebe za pumpama ili ventilima, pri čemu bi se upotrijebilo kapilarno punjenje i kraći kanal što bi omogućilo široko korištenje u medicinske i veterinarske svrhe. Također, potrebno je dodatno ispitati utjecaj anemije ili neke bolesti krvnih stanica na rezultate mjerenja kako bi se utvrdilo ima li značajan utjecaj na njih. Teorijski gledano, većina bolesti krvnih stanica rezultira različitim brojem ili oblikom u odnosu na zdrave stanice, a oblik ima malen utjecaj na akustičnu silu tako da je utjecaj vrlo vjerojatno zanemariv³⁸.

4.2. Rezultati detekcije bakterija u svrhu ranog otkrivanja sepsa

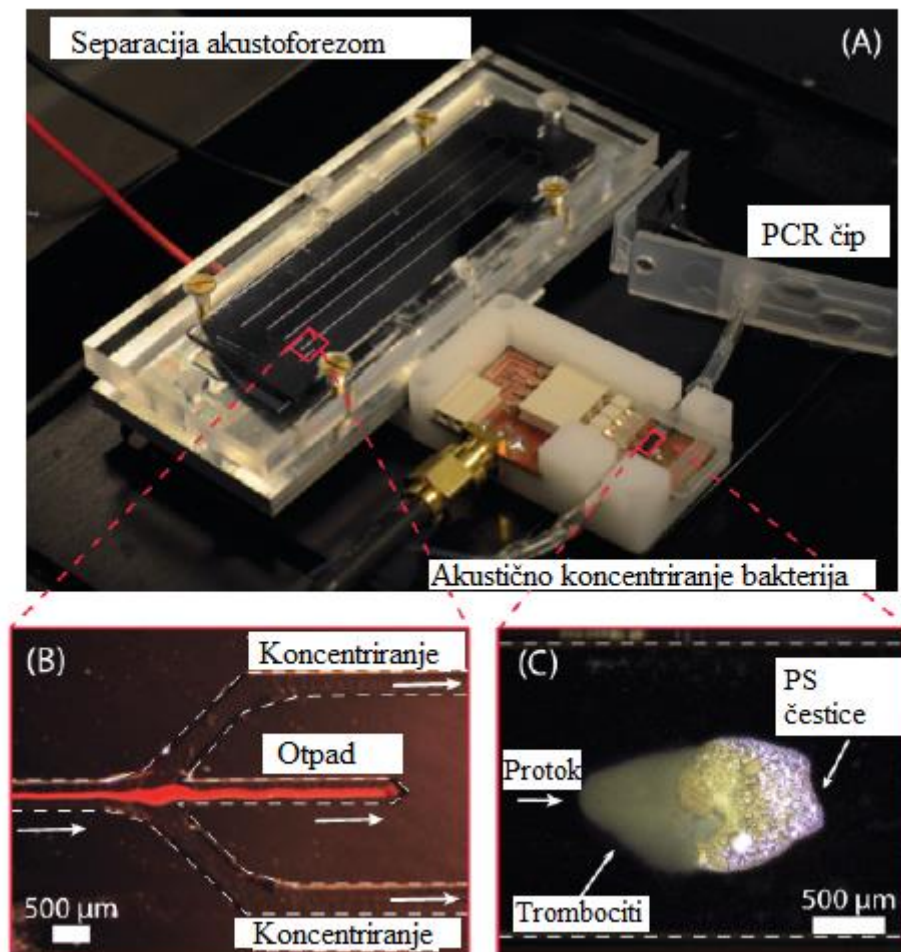
Eksperimenti provedeni prema postupku (3.2) su dali sljedeće rezultate.

Akustična separacija se testirala za dva slučaja, separaciju crvenih krvnih stanica i oporavak bakterija. Crvene krvne stanice su reducirane do $0,9 \pm 0,6$ % dok je koncentracija bakterija ostala na 91 ± 1 % u plazmi. U sustavu se provodilo koncentriranje bakterija uz pomoć akustičnog zarobljavanja pri čemu se koristila bakterija *E.coli* koja se mogla vidjeti zahvaljujući fluorescenciji. Efikasnost za akustično zarobljavanje *E.coli* pri protoku od $10 \mu\text{L}/\text{min}$ je 95 ± 3 %. Na Slici 48. vidljivi su rezultati akustičnog zarobljavanja bakterija.



Slika 48. Prikaz koncentriranja bakterija *E.coli* tijekom 10 minuta akustičnog djelovanja na suspenziju koja je sadržavala $22,2 \times 10^6$ bakterija u mL i prolazila kroz akustičnu zamku koja je sadržavala $12 \mu\text{m}$ PS čestice³⁹

Akustična separacija provedena je na kliničkim uzorcima i sa uzorcima krvi zdravih donora u koje su se dodale bakterije. Crvene krvne stanice su bile fokusirane u sredini kanala te odvedene iz sustava izlaznim, otpadnim stujama, kao što je vidljivo na Slici 50. Preostala plazma, trombociti, bakterije te poneka kontaminirajuća crvena krvna stanica su nastavili prema kapilari gdje su zaustavljeni u akustičnoj zamci na PS česticama. U sustavu je bilo vidljivo kako je mali broj crvenih krvnih stanica zaostao u plazmi dok su trombociti zaostali u većoj količini zbog male veličine i gustoće zbog čega su se sporije micali prema sredini kanala. Upravo su trombociti uvjetovali veličinu uzorka koja se mogla obraditi jer bi u većim uzorcima i njihova količina u akustičnoj zamci bila veća što bi potencijalno onemogućilo otpuštanje nakupljenih stanica u PCR čip. U nekim uzorcima kliničkih donora crvene krvne stanice su se brže sedimentirale u špricama uzrokujući veću koncentraciju crvenih krvnih stanica na početku procesa nego na kraju što je imalo utjecaj na separaciju. Također, trombociti su imali veću tendenciju da se prime za stijenke kapilare tijekom akustičnog zarobljavanja pri čemu je veća aktivnost vjerojatno posljedica infekcije.



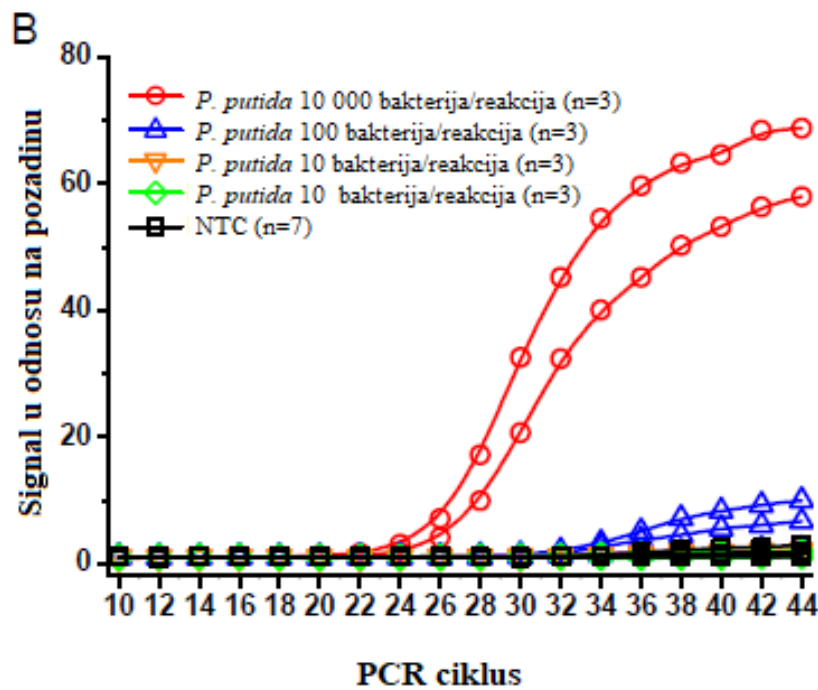
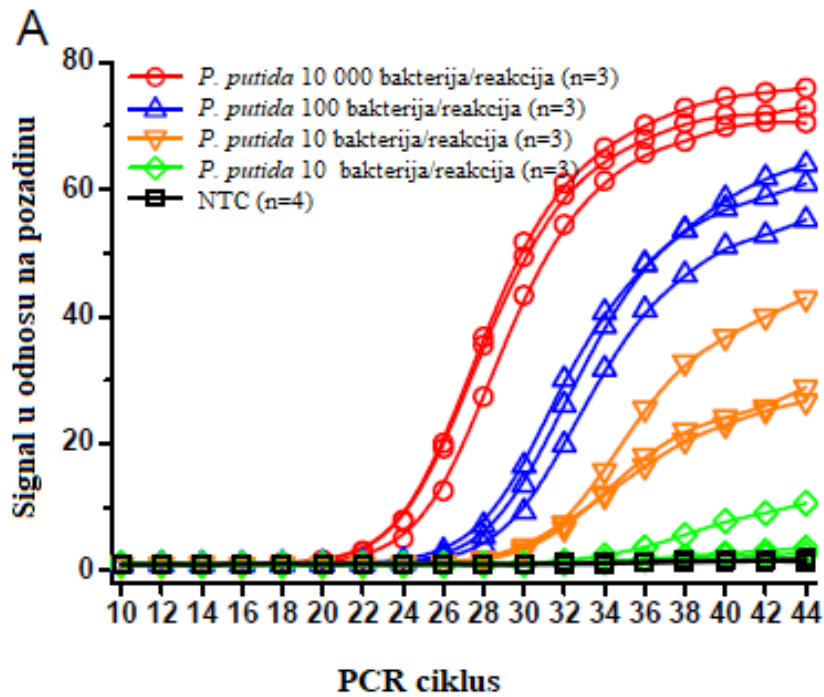
Slika 49. (A) Na slici su vidljive glavne komponente sustava: čip za akustičnu separaciju, kapilara za koncentriranje bakterija te PCR čip (B) Mikroskopska slika kraja kanala za separaciju gdje dolazi do odvajanja crvenih krvnih stanica iz sustava (C) Mikroskopska slika nakupine PS čestica, trombocita i bakterija (nisu vidljive na slici zbog manjih dimenzija) koji su zarobljene u akustičnoj zamci³⁹

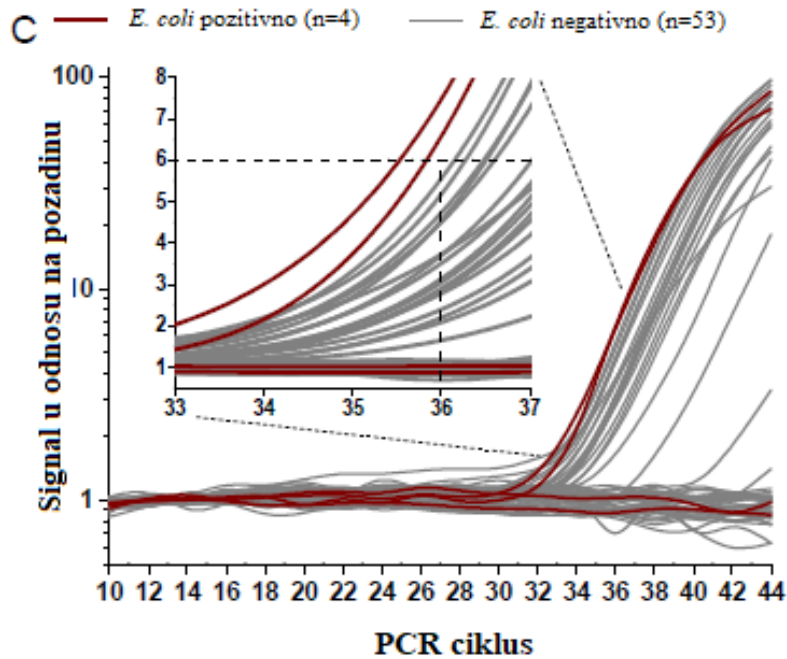
Sterilizacija sustava vršila se KCl otopinom čiji su uzorci uzeti nakon sterilizacije pri čemu su dali PCR signal sličan sterilnoj KCl otopini u čipovima za detekciju *P. putida* pri čemu se demonstriralo da nema kontaminacije s DNK *P. putida*. Također su provedena testiranja na uzorcima uzetim iz procesa sterilizacije koja su u sebi imala DNK *P. putida* koji su zatim uspoređeni sa signalom kojega je davala sterilna otopina KCl-a s istom količinom DNK bakterije pri čemu su njihovi signali bili slični ukazujući da otopina za sterilizaciju neće inhibirati PCR analizu.

PCR čipovi sa suhim reagensom su se koristili za detekciju *Pseudomonas* spp. i testirani su sa 10, 100, 1000, 10000 bakterija po reakciji pri čemu su bili uspješni u detekciji u svim uzorcima.

1 od 3 reakcija koje su sadržavale 10 *P.putida* su imale jasno izražen signal dok su preostale dvije imale tek malu distinkciju od pozadinskih signala (Slika 50. (A)). Testiranja na *E. coli*, *S. aureus* i *S. pneumoniae* su provedena u drugim istraživanjima gdje je pronađen limit za detekciju, *S. aureus* i *S. pneumoniae* 3 i 2 CFU dok je *E. coli* imala limit detekcije od 400 CFU. Osjetljivost sustava testirana je s krvlju u koju je dodano 0, 10, 100, 1000, 10 000 *P.putida* u mL citrirane krvi pri čemu su testovi provedeni tri puta (Slika 50. (B)). Niti jedan uzorak s manje od 100 bakterija nije bio detektiran na PCR testu stoga se nisu razlikovali od kontrola. Dva uzorka od 1000 i 10 000 bakterija su bili očito različiti od negativnih kontrola, odnosno po jedan uzorak s 1000 i 10 000 bakterija po mL nije bio detektiran. To se pridodalo krivoj koncentraciji bakterija pri jednom mješanju jer su navedeni negativni uzorci proizašli iz iste šarže. Rezultati ukazuju na limit detekcije od oko 1000 *P.putida* po mL citratne krvi. To se slaže s testiranjem individualnih komponenti sustava gdje je 1/8 volumena uzorka ostala u sustavu, nakon akustične separacije crvenih krvnih stanica, s koncentracijom bakterija od 91 ± 1 % u usporedbi s koncentracijom ulaznog uzorka te s koncentracijom bakterija od 95 ± 3 % koji su se našli zarobljeni u akustičnoj zamci. Odnosno, na 1000 bakterija u uzorku krvi, otprilike 100 bakterija se našlo u PCR testu što je donjnji limit za njihovu detekciju.

Klinički uzorci, uzeti od 71 pacijenta, također su testirani i to PCR testovima na tri bakterije (*E. coli*, *S. aureus* i *S. pneumoniae*) koje su najčešći uzročnici sepse u klinici iz koje su uzorci uzeti. Svi uzorci su testirani na sve tri bakterije i ukoliko nisu mogli biti procesirani isti dan kada su uzeti, spremljeni su, ali nikada više od 48 h stoga je od 71 uzorka, 57 analizirano sustavom i standardnim testovima. Sedam uzoraka je bilo pozitivno na *E. coli* (n=4) i *S. aureus* (n=3) dok *S. pneumoniae* nije pronađeno. Dvije od četiri *E. coli* su mogle biti izdvojene od svih ostalih uzoraka u sustavu jer su one jedine prešle prag detekcije u PCR ciklusu 36 (Slika 50. (C)). PCR pozitivni uzorci su imali najkraće vrijeme detekcije 4,56 h i 6,48 h dok su negativni uzorci imali dulje vrijeme detekcije 7,92 h i 9,12 h pri čemu kraće vrijeme inkubacije sugerira veći početni broj bakterija u uzorku. *S. aureus* nije detektirana u akustičnom sustavu niti u jednom uzorku, a razlog je ili premala količina bakterija u početnom uzorku ili njezina tendencija da stvara nakupine pojedinačnih bakterija što uzrokuje povećanje veličine i dolazi do njihovog centriranja i izlaska iz sustava zajedno s crvenim krvnim stanicama.





Slika 50. Prikaz PCR podataka u realnom vremenu (A) *Pseudomonas* spp. PCR čip sa suhim reagensom testiran s *P.putida* (B) Prikaz rezultata cijelog sustava sa svim testiranim uzorcima krvi (1 mL citratne krvi) u koju su dodane bakterije *P.putida* (C) *E. coli* PCR rezultati u realnom vremenu gdje su četiri uzorka pozitivna (crveno) i 53 negativna (sivo). Dvije kulture pozitivnih uzoraka se ne razlikuju od kultura negativnih uzoraka dok su dvije kulture pozitivnih uzoraka prešle prag za detekciju prije svih negativnih uzoraka. Isprekidane linije prikazuju prag detekcije i dva uzorka *E. coli* kultura koji su pozitivni i kako se razlikuju od svih ostalih³⁹

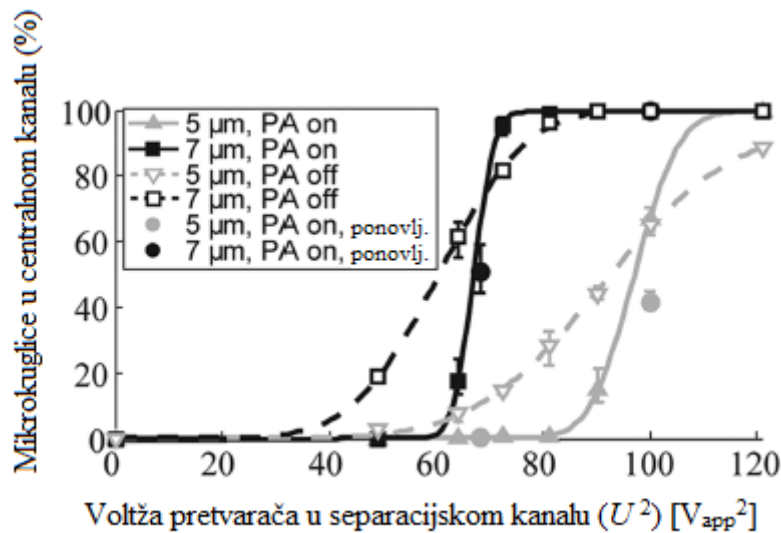
Prikazanim sustavom PCR rezultati su dostupni za manje od 2 sata što je dvostruko brže od trenutnih komercijalnih PCR testova za detekciju sepse. Testiranje krvi u koju su dodane točno određene koncentracije bakterija i krvi pacijenata ukazuje da je limit detekcije bakterija u sustavu u korespondenciji s gornjim rasponom koncentracije bakterije u pacijenata sa sepsom što ih čini pogodnim za korištenje u praksi. Naravno, na sustavu su moguća poboljšanja kao što su osjetljivost sustava, veći volumen uzorka, smanjenje granice detekcije, itd³⁹.

4.3. Rezultati koncentriranja stanica tumora iz krvi

Posljednji eksperiment promatran u ovom radu je koncentriranje stanica tumora iz krvi koji je objašnjen prethodno u tekstu (3.3).

Dva tipa mikrokuglica su korištena kako bi se odredila sposobnost akustičnog mikrokanala za akustoforezu da separira čestice na temelju veličine. Jedne mikrokuglice su bile promjera 5 μm ,

a druge 7 μm . Proporcije mikrokuglica u svakom od izlaznih frakcija su mjerene protočnom citometrijom. Veće mikrokuglice su usmjerene u centralni kanal pri manjim voltažama sustava nego one manjeg promjera. Prilikom uključenja predravnanja, prijelaz iz bočnih izlaza u centralni je bio mnogo strmiji, odnosno veće mikrokuglice su bile usmjerene u centralni izlaz dok su manje izašle kroz bočne izlaze. Suspenzija mikrokuglica sastojala se od 50 % manjih i 50 % većih mikrokuglica, a čistoća na izlazu bila je 99,2 % za mikrokuglice promjera 7 μm i 98,8 % za mikrokuglice promjera 5 μm (Slika 51.). Prije svakog eksperimenta sa stanicama provjeravala se i voltaža pri kojoj 50 % mikrokuglica promjera 7 μm izašlo iz sustava kroz centralni izlaz. Za ovaj mikrokanal, pokazalo se kako ta voltaža odgovara gustoći akustične energije (E_{ac}) od 69 J / m³.



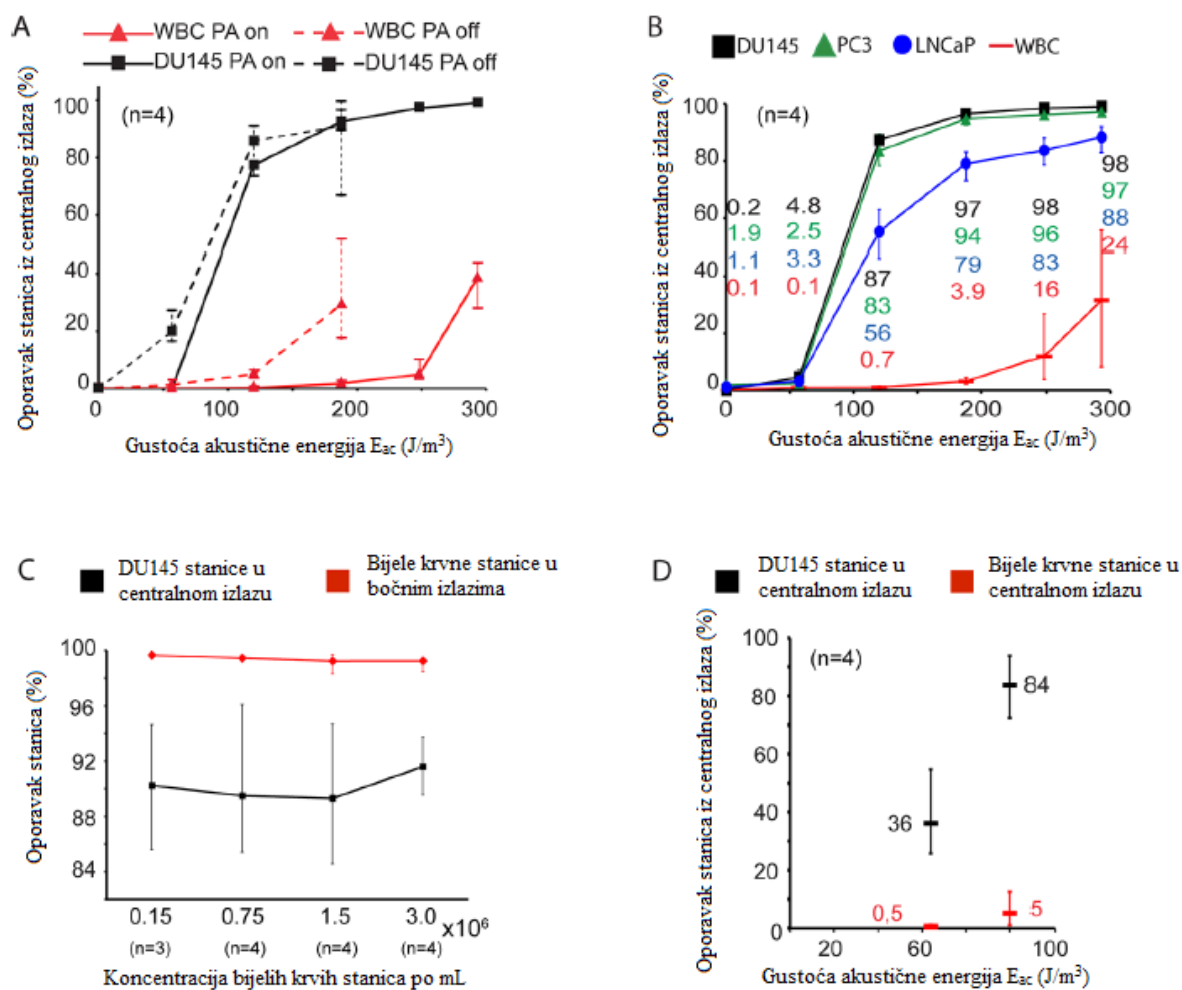
Slika 51. Separacija mikrokuglica akustoforezom. Prikaz proporcija mikrokuglica promjera 5 μm (sivo) i 7 μm (crno) koje su izašle iz sustava kroz centralni izlaz, uspoređeno s ukupnim brojem mikrokuglica sakupljenim kao funkcija U^2 , kvadrata voltaže piezokeramičkog pretvornika. Eksperimenti su provedeni sa i bez predravnanja (PA) pri čemu linije predstavljaju kumulativne distribucijske funkcije eksperimentalnih podataka⁴⁰

Promatralo se i predravnanje stanica raka prostate (DU145) koje su bile PFA-fiksirane u PFA-fiksiranoj krvi. Proučavale su se prednosti predravnanja stanica na različitim vrijednostima akustične energije prije same separacije. Mogućnost oporavka stanica u centralnom izlazu povećala se s povećanjem akustične energije, a gustoća akustične energije za stanice raka bila je oko 30 % energije potrebne za fokusiranje bijelih krvnih stanica u centralni izlaz (Slika 52.

(A)). Ispitivanje pokazuje kako se suspenzija sa visokim oporavkom stanica raka može biti generirana u centralnom izlazu namještajući razinu akustične energije.

U pokušaju da se prikaže različitost CTC-a u perifernoj krvi pacijenata s rakom prostate u fazi metastaziranja, upotrebljene su tri vrste stanica raka prostate: DU145, PC3 i LNCaP. Stanice su se dodavale u krv s liziranim eritrocitima i uvedene su u proces akustoforeze pri različitim vrijednostima akustične energije za predravnanje. Eksperimentalno se pokazalo kako je moguće razdvojiti bijele krvne stanice od sva tri tipa stanica raka prostate korištena pri čemu su DU145 i PC3 stanice pokazivale slične uzorke separacije. Za vrijednost akustične energije od $120 \text{ J} / \text{m}^3$ prosječan oporavak stanica je bio 85,4 % pri čemu se separiralo 99,3 % bijelih krvnih stanica. Pri vrijednosti od $188 \text{ J} / \text{m}^3$ prosječan oporavak DU145 stanica bio je 96,6 % dok je 97,9 % bijelih krvnih stanica bilo uklonjeno iz sustava. S druge strane, stanice raka LNCaP su pokazivale nešto slabije rezultate te pri akustičnoj energiji od $120 \text{ J} / \text{m}^3$ pokazivale su oporavak od 55,5 % odnosno od 78,8 % pri $188 \text{ J} / \text{m}^3$ (Slika 52. (B)). Daljnjim istraživanjem zašto su LNCaP stanice pokazivale slabije rezultate, određeno je kako je distribucija veličine populacije stanica u sva tri tipa stanica podjednaka odnosno da su PC3 stanice malo manje od druga dva tipa. S obzirom da se veličina bijelih krvnih stanica znatno razlikuje od onih stanica tumora, utjecaj njihove veličine također može biti zanemaren. Pripremljena je serija razrijeđene krvi s liziranim eritrocitima kako bi se vidjelo utječe li koncentracija krvnih stanica na uspješnost separacije stanica međutim rezultati su pokazali kako to nije slučaj (Slika 52. (C)).

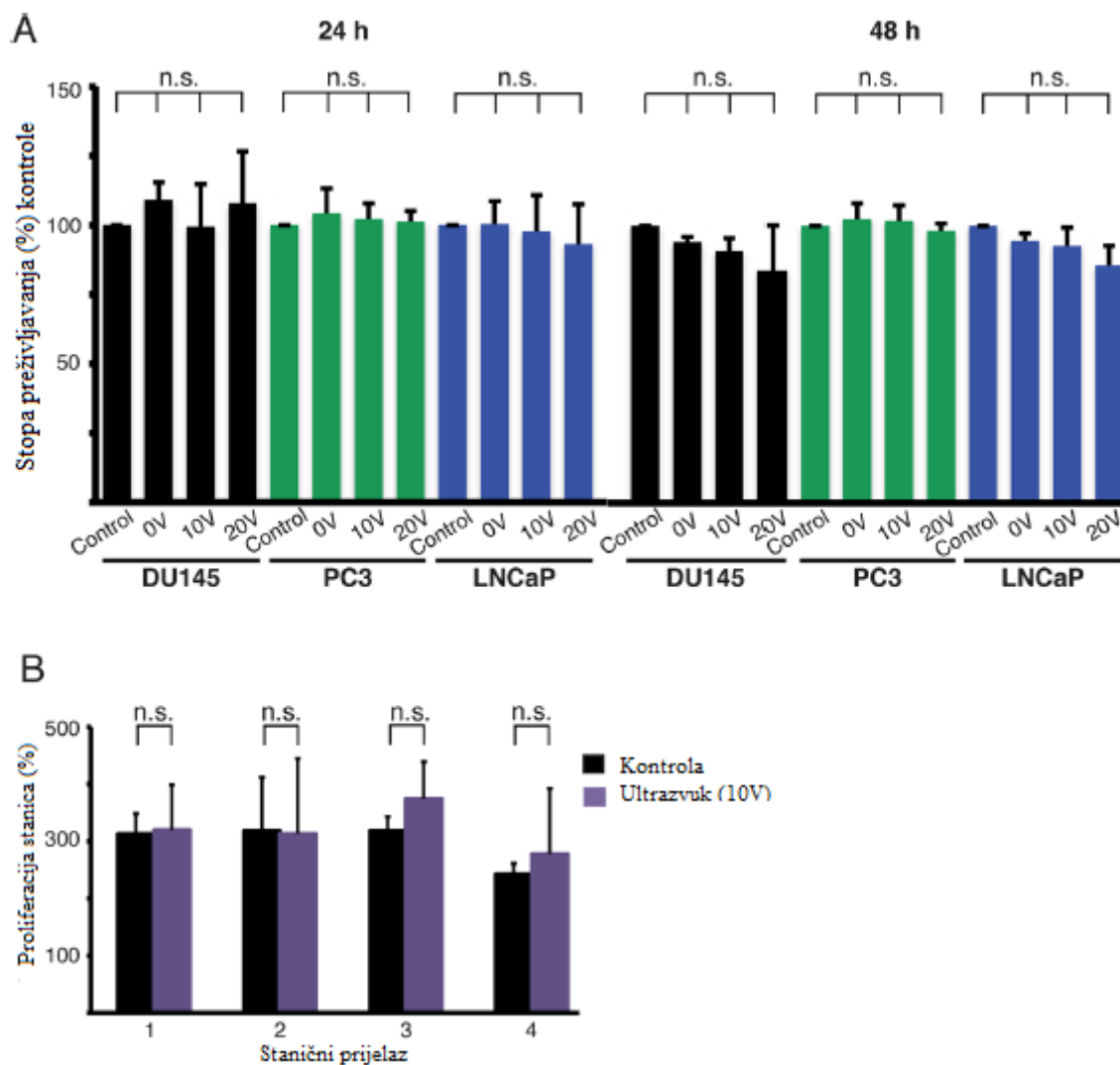
Nakon eksperimenata s fiksiranim stanicama, provedeni su oni s nefiksiranim, održivim stanicama (definirane kao: stanice u rastu ili stadiju diobe, žive) kako bi se utvrdilo može li se navedena metoda provoditi i na njima. Održive DU145 stanice dodane su u nefiksiranu krv liziranim eritrocitima i uvedene u sustav za akustoforezu pri dvije različite vrijednosti akustične energije. Na centralnom izlazu, pri energiji od $103 \text{ J} / \text{m}^3$, oporavak stanica bio je 83,7 %, a separacija bijelih krvnih stanica je bila 94,9 % ukazujući na čistoću stanica raka od 93,0 %. Pri energiji od $66 \text{ J} / \text{m}^3$, čistoća stanica raka pri izlazu iz centralnog izlaza bila je 99,5 % međutim oporavak stanica bio je tek 36,1 % (Slika 52. (D)).



Slika 52. Prikaz utjecaja predravnanja (PA) na koncentriranje stanica raka, mjerena su vršena protočnom citometrijom. (A) Prikaz efekta predravnanja PFA-fiksiranih DU145 stanica (crno) i bijelih krvnih stanica (crveno) pri čemu je sustav za predravnanje uključen (puna linija) ili isključen (isprekidana linija) (B) Separacija triju različitih stanica raka prostate (DU145, PC3 i LNCaP) od krvnih stanica akustoforezom s predravnanjem (C) Separacija DU145 stanica (250 000/mL) pri različitim koncentracijama bijelih krvnih stanica pri $120 V_{pp}^2$ s aktivnim predravnanjem (D) Separacija živih DU145 stanica od krvnih stanica akustoforezom s predravnanjem⁴⁰

Provjeravao se i utjecaj akustoforeze na intrinzična svojstva stanica raka prostate, pa se tako mjerila održivost stanice pri dvije temperature: $25,0 \pm 0,5$ °C i $37,0 \pm 0,5$ °C. Održivost stanica određivala se XTT testom mjereći aktivnost mitohondrijske dehidrogenaze u živim staniama nakon 24 i 48 h (Slika 53. (A)). Istraživanje je pokazalo da nema značajnije promjene u održivosti stanica koje su tretirane akustoforezom i onih koje nisu, pokusi su provedeni na sva tri tipa stanica raka korištenih u radu. Akustoforeza nije utjecala niti na staničnu proliferaciju

niti na sposobnost stanica da budu rekultivirane nekoliko puta (Slika 53.(B)). Žive i mrtve stanice su izbrojane koristeći se Trypan plavom metodom obojenja i izbrojane u Bürkerovoj komori. Istraživan je i efekt pufera za liziranje crvenih krvnih stanica na stanice raka, ali se pokazalo kako on nema utjecaja na održivost stanica raka.



Slika 53. Utjecaj akustoforeze na održivost i proliferaciju stanica raka. (A) Održivost stanica (DU145, PC3 i LNCaP) nakon 24 i 48 h pri voltazama pretvarača od 0, 10, 20 V.

Eksperimenti su provedeni minimalno tri puta (B) Proliferacija DU145 stanica nakon akustoforeze i uspoređena s kontrolnom grupom. Stanice su kultivirane kroz četiri prijelaza od 60 h. Broj stanica na 0 h za svaki prijelaz je bio 100 %⁴⁰

Ovo istraživanje pokazuje da akustoforeza s predravnanjem omogućuje nediskriminirajuću izolaciju tumorskih stanica u uzorku s velikom koncentracijom bijelih krvnih stanica te kako PFA-fiksirane isto kao i održive stanice mogu biti separirane. Genetska analiza PFA-fiksiranih

stanica raka i detaljne analize o njihovim preslagivanjima mogu doprinijeti dijagnozama i anemnezama, pogotovo ako se poboljšaju neka svojstva poput volumena uzorka kako bi se naveden sustav moglo primijeniti u praksi⁴⁰.

5. ZAKLJUČAK

Akustoforeza je metoda separiranja i manipuliranja česticama unutar fluida uz pomoć ultrazvučnih valova. Ona omogućuje separaciju čestica koja se bazira na mehaničkim svojstvima poput gustoće, veličine, oblika te kompresibilnosti. Najviše pažnje trenutno se pridodaje upotrebi akustoforeze u medicinske svrhe za separaciju komponenata krvi odnosno sustavima na mikroskali, ali ona ima potencijalnu primjenu i u drugim segmentima života i industrije. U ovom radu opisani su fizikalni zakoni ponašanja fluida na mikroskali i razlika u njihovom ponašanju od onog na makroskali te ponašanje UZV valova koje se koriste za separaciju čestica u fluidu. Opisana je izrada sustava za akustoforezu i materijali od kojih se ti sustavi najčešće rade te su obrađena tri rada u kojima se ispitivala primjena akustoforeze: određivanje hematokrita, koncentriranje bakterija u svrhu otkrivanja sepse te koncentriranje tumorskih stanica. Sva tri slučaja su se pokazala uspješnima odnosno kod svakog eksperimentalnog rada separacija ciljanih čestica od ostatka uzorka bila je provedena s visokom stopom efikasnosti.

Unatoč dobrim rezultatima istraživanja, ova metoda dolazi sa svojim nedostacima. Primarni je problem uvesti ovakve sustave na funkcionalnu razinu gdje ih se može koristiti u bolnicama i klinikama u dijagnostičke svrhe. Za takvo široko korištenje u praksi, mora biti provedeno još istraživanja o ponašanju stanica i komponenata krvi pod utjecajem UZV valova, riješiti pitanja mogućih začepjenja mikrokanala, omogućiti jednostavno i dugotrajno korištenje ovakvih sustava koji neće predstavljati kontaminacijski rizik. Trenutni je način izrade sustava skup i to je jedan od razloga zašto je primjena u praksi tako daleka, a moguće rješenje leži 3D printanju mikroreaktora koje bi zahtjevalo posebnu pažnju na odabiru i poboljšanja trenutnih materijala koji se koriste kao filament.

Akustoforeza, kao način separacije čestica ili manipulacije fluida, tema je vrijedna daljnjeg istraživanja jer je njena potencijalna primjena raznolika i trenutni nedostaci sustava će zasigurno biti riješeni napretkom tehnologije i novim istraživanjima.

Popis kratica i simbola

FFA- *Free Flow Acoustophoresis*

PCR- *Polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimeraza- metoda kojom se omogućuje kopiranje dijelova DNA pomoću enzima DNA polimeraze

PMMA- Polimetil metakrilat

IPTG- izopropil tio-beta-D-galaktozid, djeluje kao induktor aktivnosti galaktozidaze vezanjem i inhibicijom represora

ACCP- *American College of Clinical Pharmacology*

SCCM- *Society of Critical Care Medicine*

EDTA- Etilendiamintetraoctena kiselina

IgG-APC- tip imunoglobulina G

PFA- Paraformaldehid

7-AAD- 7-Aminoaktinomicin D

PBS- Fiziološka otopina s fosfatnim puferom

XXT- standardni komplet za proliferaciju stanica

HCT- hematokrit

PS- polistiren

KCl- kalijev klorid

CFU- *Colony-forming unit*, jedinica za procjenu živih bakterija u uzorku

PA- *Pre-alignment*, predravnanje

n.s.- *nonsignificant differences*

Literatura

1. <https://www.who.int/news/item/03-02-2017-early-cancer-diagnosis-saves-lives-cuts-treatment-costs> (pristupljeno 9.8.2021.)
2. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis> (pristupljeno 9.8.2021.)
3. <https://cdn.britannica.com/65/63065-050-72A41AAC/States-matter.jpg> (pristup 20.3.2021.)
4. Matijašić G., Mehanika fluida, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016., str. 4-37.
5. Filipović I., Lipanović S., Opća i anorganska kemija I.dio, Školska knjiga, Zagreb, 1995., str. 49-52.
6. Gentle R., Edwards P., Bolton B., Mechanical Engineering Systems, Butterworth Heinemann, Oxford, 2001., str. 112-163.
7. Bi, Z., Finite Element Analysis Applications: A Systematic and Practical Approach, Academic Press, Cambridge (USA), 2018., str. 379-405.
8. Zhang J., Lattice Boltzmann method for microfluidics: Models and applications, *Microfluidics and Nanofluidics*, **10** (2011) 1-28.
9. Xue, X., Patel, M. K., Kersaudy-Kerhoas, M., Desmulliez, M. P. Y., Bailey, C., Topham, D., Analysis of fluid separation in microfluidic T-channels, *Applied Mathematical Modelling*, **36** (2012) 743–755.
10. Nesbitt B., Handbook of Valves and Actuators: Valves Manual International, Butterworth-Heinemann, Oxford, 2007., str. 48-51.
11. Glasnović A., Sander A., Prijenos tvari i energije, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013, str. 22-40
12. https://media.springernature.com/original/springer-static/image/chp%3A10.1007%2F978-3-319-91932-4_4/MediaObjects/186598_3_En_4_Figa_HTML.png (Pristup 1.4.2021.)
13. Stone, H. A.. Introduction to Fluid Dynamics for Microfluidic Flows. *CMOS Biotechnology* (2007) 5–30.
14. Marčec D., Stabilnost fluidnog toka u kanalima milireaktora, završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2019) 8-13.
15. Urbansky A., Acoustofluidic preparation of whole blood components, doktorski rad, Sveučilište u Lundu, Lund, (2019) 3-7.
16. Vitello, D. J., Ripper, R. M., Fettiplace, M. R., Weinberg, G. L., & Vitello, J. M., Blood Density Is Nearly Equal to Water Density: A Validation Study of the

- Gravimetric Method of Measuring Intraoperative Blood Loss, *Journal of Veterinary Medicine*, **2015** (2015) 1–4.
17. <https://wiki.anton-paar.com/en/whole-blood/> (pristup 5.4.2021.)
 18. Sochi T., *Non-Newtonian Rheology in Blood Circulation*, interna skripta, University College London, London, 2014., str. 1-15.
 19. Lowe, M. J. S., *Encyclopedia of Vibration*, Academic Press, Cambridge (USA), 2001., 1437–1441.
 20. https://www.realhd-audio.com/wp-content/uploads/2014/02/ultrasonics_chart.jpg (pristup 7.4.2021.)
 21. Fanchi, J.R., *Shared Earth Modeling*, Butterworth-Heinemann, Woburn (USA), 2002., str. 62-72.
 22. <https://www.feynmanlectures.caltech.edu/> (pristup 7.4.2021.)
 23. Manbachi, A., Cobbold, R. S. C., *Development and Application of Piezoelectric Materials for Ultrasound Generation and Detection*, *Ultrasound*, **19** (2011) 187–196.
 24. Bruus, H., *Acoustofluidics 1: Governing equations in microfluidics*, *Lab on a Chip*, **11** (2011) 3742-3751.
 25. Bruus, H., *Acoustofluidics 10: Scaling laws in acoustophoresis*, *Lab on a Chip*, **12** (2012) 1578-1586.
 26. Augustsson, P., Laurell, T., *Acoustofluidics 11: Affinity specific extraction and sample decomplexing using continuous flow acoustophoresis*, *Lab on a Chip*, **12** (2012) 1742-1752.
 27. Bruus, H., *Acoustofluidics 2: Perturbation theory and ultrasound resonance modes*, *Lab on a Chip*, **12** (2012) 20–28.
 28. Sadhal, S. S., *Acoustofluidics 13: Analysis of acoustic streaming by perturbation methods*, *Lab on a Chip*, **12** (2012) 2292-2300.
 29. Wiklund, M., Green, R., Ohlin, M., *Acoustofluidics 14: Applications of acoustic streaming in microfluidic devices*, *Lab on a Chip*, **12** (2012) 2438-2451.
 30. Wiklund, M., Hertz, H. M., *Ultrasonic enhancement of bead-based bioaffinity assays*, *Lab on a Chip*, **6** (2006) 1279-1292.
 31. Sadhal, S. S., *Acoustofluidics 15: streaming with sound waves interacting with solid particles*, *Lab on a Chip*, **12** (2012) 2600-2611.
 32. Bruus, H., *Acoustofluidics 7: The acoustic radiation force on small particles*, *Lab on a Chip*, **12** (2012) 1014-1021.

33. Lenshof, A., Magnusson, C., & Laurell, T., Acoustofluidics 8: Applications of acoustophoresis in continuous flow microsystems, *Lab on a Chip*, **12** (2012) 1210-1223.
34. Lenshof, A., Evander, M., Laurell, T., Nilsson, J., Acoustofluidics 5: Building microfluidic acoustic resonators, *Lab on a Chip*, **12** (2012) 684-695.
35. Wiklund, M., Acoustofluidics 12: Biocompatibility and cell viability in microfluidic acoustic resonators, *Lab on a Chip*, **12** (2012) 2018-2028.
36. Evander, M., Nilsson, J., Acoustofluidics 20: Applications in acoustic trapping, *Lab on a Chip*, **12** (2012) 4667-4676.
37. Wiklund, M., Radel, S., Hawkes, J. J., Acoustofluidics 21: ultrasound-enhanced immunoassays and particle sensors, *Lab Chip*, **13** (2013) 25–39.
38. Petersson, K., Jakobsson, O., Ohlsson, P., Augustsson, P., Scheduling, S., Malm, J., Laurell, T., Acoustofluidic hematocrit determination *Analytica Chimica Acta*, **1000** (2018) 199–204.
39. Ohlsson, P., Evander, M., Petersson, K., Mellhammar, L., Lehmusvuori, A., Karhunen, U., Laurell, T., Integrated Acoustic Separation, Enrichment, and Microchip Polymerase Chain Reaction Detection of Bacteria from Blood for Rapid Sepsis Diagnostics, *Analytical Chemistry*, **88** (2016) 9403–9411.
40. Augustsson, P., Magnusson, C., Nordin, M., Lilja, H., & Laurell, T., Microfluidic, Label-Free Enrichment of Prostate Cancer Cells in Blood Based on Acoustophoresis, *Analytical Chemistry*, **84** (2012) 7954–7962.

ŽIVOTOPIS

Dorotea Marčec ██████████ Osnovnoškolsko obrazovanje stječe u Zagrebu i Velikoj Gorici, a srednjoškolsko u općoj Gimnaziji u Velikoj Gorici. Nakon završene srednje škole, školovanje nastavlja na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije gdje 2019. završava preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala sa završnim radom "Stabilnost fluidnog toka u kanalima milireaktora". Praksu odrađuje u kontrolnom i razvojnom laboratoriju u Mazivi Zagreb. Jedna je od dobitnica nagrade "PRINTCR3DIT Challenge 2018." za rad "Millireactors with prismatic static mixers for synthesis of dibenzalacetone" kojeg je dodijelio norveški istraživački institut SINTEF te koji je 2019. bio objavljen kao znanstveni članak u časopisu Chimica oggi-chemistry today. Dobitnica je Dekanove nagrade u akademskoj godini 2018./2019. za rad "Oblikovanje i simulacija toka fluida u milireaktorima korištenjem programskog sustava ANSYS". Upisuje diplomski studij, smjer Ekoinženjerstvo, 2019. godine te je trenutno studentica druge godine diplomskog studija. Izvan fakulteta, radi u telekomunikacijskoj kompaniji od 2016. godine.