**شبیه سازی جداسازی اسپرم­های متحرک در یک تراشه میکروسیالی به کمک ویژگی ذاتی**

علی شرافت دوست اصل1، محمد ضابطیان طرقی2\*، سروش ضیائی3، ایمان حلوایی4

|  |  |
| --- | --- |
| 1 دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده مهندسی مکانیک دانشگاه تربیت مدرس، تهران | ali.sharafatdoust@modares.ac.ir |
| 2\* عضو هیات علمی دانشکده مهندسی مکانیک دانشگاه تربیت مدرس، تهران | zabetian@modares.ac.ir |
| 3 دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده مهندسی مکانیک دانشگاه تربیت مدرس، تهران | soroush.zeaei@modares.ac.ir |
| 4 عضو هیات علمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران | ihalvaei@modares.ac.ir |

# چكيده

از روش های میکروسیالی برای افزایش نرخ راندمان جداسازی استفاده می­شود که به دو صورت روش فعال و غیر فعال است. در روش غیرفعال بر خلاف روش فعال هیچ­گونه نیروی خارجی وجود ندارد و جداسازی بر اساس ویژگی ذاتی اسپرم و هندسه میکروکانال است و سعی می­شود هرگونه ریسک و آسیب به ساختار DNA را تا حد ممکن کاهش یابد. در مطالعه پیش­رو با استفاده از تراشه میکروسیالی به روش غیرفعال با ابعاد هندسی مشخص در ابتدا طرح تراشه به گونه‌ای در نظر گرفته شده است که اسپرم‌های متحرک و بارور بتوانند از طریق شنای ذاتی خود، نسبت به اسپرم‌های کم تحرک و نابارور متمایز باشند. بدین منظور با انجام شبیه سازی سه بعدی تراشه به بررسی سازگاری با ویژگی­های ذاتی اسپرم پرداخته شده و با تعریف دبی بهینه ورودی برای جریان بافر و اسپرم و با استفاده از کوپل نیرویی معادلات پخش و همرفتی جرمی، نیرویی به نام نیروی دیفیوزوفورسیس تعریف می‌گردد. همچنین سایر نیروهای موثر در روند شبیه سازی اعمال شده و سپس ردیابی ذرات نفوذ کرده انجام می­شود. با بررسی نتایج مشاهده می­شود که علاوه بر استفاده از ویژگی­های ذاتی اسپرم با حفظ تمامیت DNA اسپرم­ها و کاهش زمان جداسازی، اسپرم­های سالم و بارور با عبور از غلاف جریان و انجام عمل رئوتاکسی و شنا کناره دیواره به سمت خروجی مورد نظر حرکت می­کنند.

**کليدواژه­ها:** میکروسیال، ناباروری، رئوتاکسی، حرکت ذاتی، روش اینرسی، روش غیرفعال

**Simulation of motile sperms separation in a microfluidic chip using intrinsic characteristics**

**A.Sharafatdoust Asl 1, M.Zabetian Targhi 2\*, S.Zeaei3,I.Halvaei 4**

|  |  |
| --- | --- |
| 1MSc Student, Mechanical Engineering Department, Tarbiat Modares University, Tehran | ali.sharafatdoust@modares.ac.ir |
| 2\*Associate Professor, Mechanical Engineering Department, Tarbiat Modares University, Tehran | zabetian@modares.ac.ir |
| 3MSc Student, Mechanical Engineering Department, Tarbiat Modares University, Tehran | soroush.zeaei@modares.ac.ir |
| 2Assistant Professor, Medical Sciences Department, Tarbiat Modares University, Tehran | ihalvaei@modares.ac.ir |

**Abstract**

Microfluidic methods are used to increase separation efficiency by active and passive methods. Unlike the active method, there is no external force in the passive method, and the separation is based on the inherent characteristics of the sperm and microchannel geometry. Therefore, attempts are made to reduce any risk and damage to the DNA structure as much as possible. In the upcoming study, using a passive microfluidic chip with specific geometrical dimensions, the chip's design has been considered so that motile and fertile sperms can be distinguished from non-motile and infertile sperms through their inherent swimming. For this purpose, by carrying out a 3D simulation of the chip, the compatibility with the inherent characteristics of sperm was investigated, and by defining the optimal flow rate of the input for the flow of buffer and sperm and using the force couple of diffusion, and mass convection equations, a force called diffusiophoresis force was defined. Also, other effective forces are applied in the simulation process, and then tracking penetrated particles is done. By examining the results, it can be seen that in addition to using the inherent characteristics of sperm by maintaining the integrity of the DNA of sperms and reducing the time of separation, healthy and fertile sperms can pass through the flowing sheath and perform rheotaxis and swim alongside the wall towards the desired outlets.

**Keywords:** Microfluidic chip, Sperm separation, Rheotaxis, Infertility, Passive method

**مقدمه**

تراشه های میکروسیالی برای افزایش راندمان نرخ جداسازی اسپرم های متحرک استفاده می­شود، فناوری میکروسیالی با هدف افزایش دقت و تسریع در نتیجه آزمایش تعریف شده است. ناباروری یکی از مشکلات رو به رشد جامعه بشری می­باشد که امروزه به­طور گسترده زندگی 1 زوج از هر 6 زوج را در سرتاسر دنیا تحت تاثیر قرار داده است.، پس بروشی روش مطلوب است که ابتدا بتوان کیفیت اسپرم انتخاب شده را بالا برد همچنین خطای انسانی در آن دخالتی نداشته باشد، سریع و با قیمت مناسب در دسترس باشد.

در همین راستا علم میکروسیال یک روش کارآمد نسبت به روش های قدیمی است که علاوه بربازده بالا خطای انسانی در انتخاب نمونه دخالتی ندارد. روش میکروسیال بر اساس گزینش دقیق اسپرم و با محیطی مشابه دستگاه تولید مثل زن بازسازی شده است. علاوه بر آن تراشه ها جداسازی که بر اساس علم میکروسیال طراحی شده­اند و آزمایش با روش های نمونه برداری مرسوم بسیار گران و زمان بر منجر به ازدست رفتن نمونه می­شود. تراشه­های جداسازی که بر اساس علم میکروسیال طراحی شده اند، به دو دسته روش های فعال و غیر فعال تقسیم می شوند. روش‌های جداسازی غیر فعال برای انتخاب اسپرم متحرک مورد نیاز برای لقاح مصنوعی بر اساس استفاده از ویژگی اسپرم ذاتی از جمله کموتاکسی، ترموتاکسی، رئوتاکسی و دنباله روی از مرز­ می­باشد [1].

هانگ و همکاران [2] در سال 2014، با توجه به ویژگی اسپرم در شنا در کناره دیواره­ها تراشه­ای با دو مخزن ورودی برای اسپرم و بافر و سه مخزن برای خروجی برای اسپرم­های فعال و یک خروجی برای اسپرم­های غیر فعال در نظر گرفتند. با ایجاد انحراف­هایی در مسیر با بهره گیری از ویژگی حرکتی اسپرم، اسپرم متحرک به سمت خروجی های مورد نظر منتقل می­شود.

وو و همکاران [3] در سال 2017، تراشه ای طراحی کردند که بر اساس کار آن بر پایه­ی توانایی اسپرم در شنا کردن در خلاف جهت جریان در یک دبی مشخص می­باشد. در این روش یک ورودی و یک خروجی وجود دارد که در آن با اسپرم، با دبی بالا وارد میکروکانال می­شود و در آن شروع به حرکت می­کند، ولی در میانه میکروکانال منبسط شده و سرعت جریان کاهش می یابد با توجه به حرکت اسپرم های متحرک در خلاف جهت جریان اسپرم های مرده و سایر ذرات جدا می­شوند و اسپرم های متحرک از سایر ذرات جدا شده و به بخش جمع آوری هدایت می­شوند.

در سال 2018 زعفرانی و همکاران [4] به صورت عددی و با ارائه مدلی برای حرکت اسپرم و بررسی سرعت جریان(با دبی های مختلف) با توجه به تحرک نمونه ها با ایجاد یک ناحیه رئوتاکسی و استفاده از ویژگی حرکتی اسپرم، با کنترل دبی و سرعت جریان کنترل اقدام به جداسازی نمود،­ که دقت بالا روش را نشان می­دهد. در این روش بدون اعمال نیروهای فعال انجام می­گیرد، پس این روش غیر تهاجمی اسپرم­های متحرک را به طور دقیق و تنظیم شده از سایر نمونه­ها با متکی بر رفتار رئوتاکسی اسپرم و با ایجاد ناحیه ای که فقط اسپرم­های متحرک و فعال قادر به شنا در بالادست هستند جدا می­کند. بازده این روش 100 درصد و تمامی اسپرم های جمع شده دارای تحرک طبیعی هستند.

هانگ و همکاران [5] در سال 2017، یک تراشه میکروسیالی طراحی کردند که در آن از سه جریان موازی مختلف برای جداسازی اسپرم‌های فعال از غیرفعال استفاده شده است. در این تراشه، سرعت جریان بافر 8 برابر نسبت اسپرم، از دو ورودی بالا و پایین وارد می شود و اسپرم‌های مرده را به سمت مخزن‌های خروجی هدایت می­کند. تفاوت سرعت باعث می شود تنش برشی مقدار بالایی داشته باشد؛ بنابراین اسپرم‌های فعال با شکافتن مسیر وارد بافر شده و به سمت مخزن جمع‌آوری می‌روند. همچنین افزایش سطح مقطع، سبب کاهش سرعت بافر شده است که در سهولت ورود اسپرم به بافر تاثیرگذار است. در این تراشه رفتار سیال با کنترل سرعت و جریان به صورت لایه ای می­باشد.

فیفات تانافیفوپو همکاران [6] در سال 2020، تراشه ای میکروسیالی برای جداسازی اسپرم با کارایی و درصد بازدهی بالا را طراحی نمودند، در این تراشه با محاسبه رینولدز که برای کانال­های کوچک که جریان به صورت خزشی است، اقدام به تعریف ضریب نفوذ کرد. به دلیل سرعت بافر نسبت به اسپرم، نمونه اسپرم، بافر را شکافته و به سمت محل جمع آوری می­رود. در اینجا اسپرم فعال به سمت جایی می­رود که غلظت کمتری باشد یعنی تمایل اسپرم فعال به مهاجرت به سمت مرز جریان که تغییرات غلظت مقدار بیشتری است. درصد جداسازی بازده برای ذرات خروجی 96 درصد گزارش شد، که نشان دهنده حضور اسپرم های فعال در خروجی مورد نظر می­باشد.

کانگ و همکاران [7] در سال 2019، تراشه طراحی کردند که یک دستگاه خودکار میکروسیالی است که با استفاده از نیروی جاذبه برای ایجاد جریان سیال بدون نیاز به پمپ اضافی استفاده می­شود. با استفاده از مکانیزم رئوتاکسی با القای شنای در بالادست فرآیند جداسازی انجام می­گیرد. از معایب استفاده از این روش بیش از حد بودن زمان جداسازی و تعداد محدود اسپرم های متحرک به دست آمده است. یک خروجی در قسمت پایین آن قرار گرفته است، برای کنترل میزان تزریق و مکش برای اسپرم متحرک از یک کنترل کننده استفاده می شود، زمان آزمایش به نزدیک 80 ثانیه صورت گرفته است.

در مطالعات اخیر که سعی در استفاده از ویژگی­های ذاتی اسپرم در جداسازی اسپرم­های متحرک از غیر متحرک انجام شده است، ولی با وجود عدم اعمال نیرو در روش­های غیر فعال و همچنین سادگی طرح تراشه­ها گاها نرخ جداسازی و همچنین درصد بازدهی کم بوده و همچنین شبیه سازی حرکت ذرات و اسپرم و اثر نیروها و بررسی تعامل نیروها در این مطالعات انجام نشده است، گاها روند جداسازی در مدت زمان بسیار طولانی انجام می­شود که به اسپرم­های سالم تحت تاثیر این زمان جداسازی، دچار آسیب شوند. در مطالعه عددی صورت گرفته برای برطرف کردن این ایرادات اقدام شده، همچنین با بررسی حرکت و نفوذ ذرات اسپرم به داخل کانال­های خروجی عملکرد تراشه برای جداسازی اسپرم های فعال و متحرک از اسپرم­های غیر متحرک و سایر دبری ها مطلوب است.

**هندسه و شماتیک تراشه**

مطابق شکل 1 از ورودی 1 نمونه (شامل دبری و اسپرم های متحرک و غیر متحرک) با دبی Q وارد می­شود، در مقابل از ورودی 2 بافر با دبی Q1.5 وارد کانال می­شود. سرعت بالا بافر نسبت به اسپرم این اجازه را می­دهد که فقط اسپرم ها سالم و متحرک که نسبت به سایر اسپرم ها سرعت بیشتری دارند توانایی شکافت جریان داشته باشند. همچنین با طراحی ارایه هایی در داخل کانال های جمع آوری سعی شده است که اسپرم هایی که عمل رئوتاکسی(شنا در خلاف جهت جریان را انجام می­دهند) با رسیدن به کنار این ارایه ها به سمت محل جمع آوری حرکت کنند.

برای قسمت جمع­آوری کانال­های خروجی 1 برای اسپرم­های غیر متحرک و دبری و سایر سلول­های خونی(مانند گلبول­های سفید) در نظر گرفته شده است و کانال های خروجی 2 برای خروجی اسپرم­های متحرک جداسازی شده تعبیه شده است.

پایه و اساس این روش، ویژگی­های ذاتی اسپرم یعنی توانایی اسپرم در شنا کردن درون سیال، همچنین رفتار آن در حرکت نزدیک دیواره­ها و تاثیر لزجت و تغییرات غلظت بر روی حرکت آن است.

|  |
| --- |
|  |
| شکل 1: شماتیک میکروتراشه طراحی شده |

پارامترهای هندسی میکروتراشه طراحی شده در جدول 1 آمده است. در میکروتراشه اسپرم­ها که با سرعت بالا شنا می­کنند فرصت زیادی برای نفود به سمت محل های جمع آوری دارند، به طوری که در مرکز کانال سرعت این اسپرم­ها بیشترین مقدار است.

جدول1: پارامتر های هندسی میکروتراشه

|  |  |
| --- | --- |
| پارامتر | مقدار (واحد) |
| طول کانال ورودی اسپرم | (μm)500 |
| طول کانال ورودی بافر | (μm)500 |
| طول کانال خروجی 1 | (μm)0.85 |
| طول کانال خروجی 2 | (μm)0.8 |

**معادلات حاکم**

معادلات حاکم به کار رفته در شبیه­سازی عددی در نرم­افزار کامسول شامل معادلات ناویر استوکس و معادلات بقای جرم است، که در این بخش ارائه می­شود. برای به دست آمدن میدان جریان و نرخ برش در داخل میکروکانال در ابتدا معادله پیوستگی مورد بررسی قرار می­گیرد. با در نظر گرفتن مسیر ورود در جریان که عمود بر سطح مقطع است همانطور که در شکل 2 مشاهده می شود سرعت ورودی جریان در راستای محور مختصات x برابر با u(x) است که در معادله (1) میزان دبی حجمی عبوری از این سطح مقطع برابر است با:

|  |  |
| --- | --- |
| (1) |  |

|  |
| --- |
|  |
| شکل 2: سطح مقطع ورودی |

در کانال طراحی‌شده، اسپرم رقیق شده و بافر با نسبت جریان 1:1 از ورودی 1 و 2 وارد کانال می­شوند. برای به دست آوردن جریان در داخل میکروکانال مقدار عدد رینولدز (Re) از رابطه زیر استفاده می­شود:

|  |  |
| --- | --- |
| (2) |  |

در رابطه (2) منظور از L، ρ، μ و U به ترتیب عرض میکروکانال، چگالی نمونه، ویسکوزیته نمونه و سرعت جریان در داخل تراشه می­باشد. با توجه به اینکه در جریان­های میکروسیالی، ابعاد تراشه در مقیاس میکرون می­باشد، در نتیجه عدد رینولدز همانند عدد گزارش شده در معادله (2) مقدار کوچکی است و می­توان رژیم جریان را در محدوده جریان لایه ای بیان نمود. با محاسبه دقیق با توجه به جدول 2 مقادیر مقدار عدد رینولدز در تراشه طراحی شده که بیان کننده این است جریان در محدوده جریان خزشی است.

جدول 2: مقادیر ثابت در محاسبه جریان در کانال

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| رديف | پارامتر | علائم | مقدار(واحد) |
| 1 | دبی جریان |  | (μl/min) 0.5 |
| 2 | عرض میکروکانال |  | ) 0.5 mm ( |
| 3 | چگالی نمونه |  | (kg/m^3)1000 |
| 4 | ویسکوزیته نمونه |  | [kg/(ms)] 0.00089 |
| 5 | ضریب پخش | D | (μm/s) 0.00015 |
| 6 | اندازه اسپرم(سر) | r | (μm)5 |
| 7 | اندازه دبری | m | (μm)10 |

در این مطالعه فرضیات مربوط به حل شامل فرض سیال نیوتنی و تراکم ناپذیر بودن آن و همچنین پایا و آرام بودن جریان می­باشد.

برای ردیابی ذرات در موقعیت­های مکانی مختلف با زمان­های متفاوت از معادله (3) که در آن مقدار سرعت ذره بدست می­آید با محاسبه مقدار سرعت می توان موقعیت مکانی ذرات را بدست آورد استفاده می شود:

|  |  |
| --- | --- |
| (3) |  |

در این بخش به تحلیل نیروهای موجود در یک جریان حاوی ذرات پرداخته می ­شود تا میزان تاثیر این نیروها را بررسی شود، براساس جدول 2 با توجه به به ابعاد ذرات در نظر گرفته برای اسپرم و ذرات دبری و سلول های خونی در داخل تراشه از تاثیر نیروی جرم مجازی میتوان صرف نظر کرد همچنین بدلیل اینکه چگالی ذرات بسیار نزدیک به چگالی سیال موجود درون کانال است، اختلاف چگالی آن‌ها عددی بسیار کوچک می باشد می­توان از تاثیر نیروهای گرادیان برشی و شناوری صرف نظر کرد.

در ادامه بررسی نیروهای غالب در مطالعه، در ابتدا نیروی پسا که به واسطه حرکت جسمی درون سیال است پرداخته می­شود، زمانی که این اتفاق رخ میدهد برهم کنشی بین جسم و سیال رخ می­دهد. تنش برشی به علت اثرات لزجی وتنش های نرمال به علت فشار بر جسم وارد می­شوند که به برآیند این نیروها در جهت سرعت نسبی بین سیال و ذره نیروی پسا گفته می­شود.

|  |  |
| --- | --- |
| (4) |  |

*که در این رابطه،*  *چگالی فاز پیوسته،*  *بردار سرعت فاز پیوسته،* *بردار سرعت ذره،*  *مساحت ذره و*  *ضریب درگ می باشد*، در رینولدز های کوچک معادله (5) به صورت زیر ساده می شود:

|  |  |
| --- | --- |
| (5) |  |

که در معادله (5) منظور از قطر ذرات در داخل فاز پیوسته می­باشد.

|  |
| --- |
|  |
| شکل 3: نیروی برآی ناشی از دیواره و گرادیان برشی سیال |

نیروی دیگر که بر اثر چرخش ذره در سیال بر ذره وارد می­شود نیروی برآ است. در نزدیکی دیواره­های میکروکانال به دلیل اختلاف سرعت سیال با مرکز میکروکانال که مقدار سرعت سیال در آن ناحیه بیشتر است، نیرویی به ذرات وارد می شود که نیروی برآی دیواره نام دارد. همچنین ذره در نزدیکی دیواره علاوه بر فشار، نیرویی به سمت مرکز میکروکانال تجربه کرده و در نتیجه به دلیل گرادیان­های برشی به سمت دیواره کشیده می­شود، که به این نیرو نیروی گرادیان برشی گفته می­شود.

|  |  |
| --- | --- |
| (6) |  |

در رابطه (6)، *چگالی فاز پیوسته،* *قطر ذره*، *Di* فاصله بین دو دیواره،  بردار سرعت ،  بردار سرعت سیال، s نسبت فاصله ذره از نزدیکترین دیواره به *Di*، *G1* و *G2* توابعی مخصوص برحسب *s، n* بردار یکه بر روی دیواره می­باشد. همچنین نیروی برآ در صورت یکسان نبودن تابع سرعت جریان به ذره، به صورت نیروی برآ سفمن نامیده می­شود. در نتیجه معادلات(6)و (7)، دو نیروی پسا و برآ برای ردیابی ذرات شناور درون میکروکانال مورد بررسی قرار می­گیرد.

|  |
| --- |
|  |
| شکل :4 شماتیک انجام واکنش شیمیایی با ایجاد نیروی دیفیوزوفورسیس [8]. |

در ادامه به تعریف نیرویی به نام نیروی دیفیوزوفورسیس[8] برای ذراتی به نام ژانوس پرداخته می­شود. که این ذرات همانند شکل 4 به دو سمت کره اعمال می­شود، بر روی یک نیم کره از ذره ژانوس با یک لایه نازک از کاتالیزور فلزی(مانند پلاتین) پوشانده شده است، عامل حرکت در درون محلول به علت تجزیه نیم کره پلاتینی و به دنبال آن ایجاد اختلاف غلظت در دو طرف ذره شروع به طی کردن مسیر در مسیر جریان دارد. این حرکت شبیه حرکت خودرانشی رو به جلو اسپرم های متحرک می باشد.

نیروی دیفیوزوفورسیس با ترکیب با نیروی پسا استوکس به صورت رابطه (8) تعریف می شود.

|  |  |
| --- | --- |
| (7) |  |
| (8) |  |

که در آن n چگالی تعداد یا غلظت ذرات b شعاع هیدرودینامیکی  ضریب اصلاحی و  سرعت ذره ژانوس می باشد.

حال برای محاسبه تغییرات غلظت نیاز است معادلات انتقال جرم همرفتی و پخش حل شود تا تغییرات غلظت را محاسبه شود. معالادت انتقال جرم بصورت پخش و همرفتی معادلات (9) و (10) برابر است با:

|  |  |
| --- | --- |
| (9)  (10) |  |

رابطه (9) همرفت جرمی و معادله (10) قانون پخش جرمی فیک را حل کرده و تغییرات غلظت اسپرم را در شکل نشان می­دهد. منظور از J ،D ، c ، Rبه ترتیب شارجرمی، ضریب پخش، غلظت نمونه اسپرم، و نرخ واکنش می­باشد. مقدار ضریب پخش با توجه به مقاله مرجع در جدول 2 گزارش شده است.

**حرکت رئوتاکسی اسپرم**

اسپرم برای حرکت رئوتاکسی یا شنا خلاف جهت جریان علاوه بر حرکت دم نیاز به دبی کم جریان در محدوده ی شنا می باشد.در واقع هنگامي كه جرياني بادبي كم اعمال مي­شود، پديدهي رئوتاكسي رخ داده و اسپرم در خلاف جهت جريان اعمالي شنا مي­كند. بدين صورت كه در حضورسيال و ايجاد تنش برشي به دنبال آن، نيروهاي مقاوم و درگ ايجاد شده در ابتدا و انتهاي بدن اسپرم(سر و دم اسپرم)، منجر به چرخيدن اسپرم(اسپرم متحرک)به سمت مخالف جريان سیال مي­شود.ویژگی دیگر رئوتاکسی این است که در محلی که تنش برشی مقدار کم باشد (دور از دیواره ها) نیز­اتفاق می­افتد. زمانی که یک اسپرم در کانالی حاوی جریان لزج قرار می‌گیرد، قسمت سر آن به کناره کانال نزدیکتر خواهد شد. در نتیجه به سر اسپرم در مقایسه با دم اسپرم نیروی کمتری وارد خواهد شد. ای اختلاف نیرو باعث به وجود آمدن گشتاوری در سر اسپرم می شود و جهت حرکت آن را تغییر می‌دهد[9].

|  |
| --- |
| C:\Users\Ali\Desktop\Capture.PNG |
| شکل 5: شماتیک چرخش و تغییر زاویه‌ی اسپرم در کانال |

**شبیه‌سازی عددی**

در این مطالعه برای جداسازی ذرات با الگوگیری از شبیه‌سازی المان محدود با کمک از نرم‌افزار COMSOL Multi-physics 6.0 انجام گرفته است. به منظور بررسی صحت شبیه‌سازی انجام شده در این مطالعه در ابتدا، شبیه سازی انجام شده و مقایسه میزان نفوذ غلظت را با مقاله مرجع مقایسه کرده و سپس به مقایسه‌ی نتایج شبیه‌سازی با آزمایش‌های تجربی پرداخت می­شود.

فیفات تانافیفوپ و همکاران [6] در سال 2020، اقدام به طراحی و شبیه سازی تراشه ای مطابق شکل 6 نمودند. سپس نتایج با نمونه آزمایشگاهی مقایسه شده که نشان دهنده ی اختلاف ناچیز بین نتیجه شبیه سازی و آزمایش میکروتراشه است، مطابق شکل 6 در این تراشه سرعت جریان ورودی برای اسپرم 0.24 میکرولیتر بر دقیقه که از ورودی 1 وارد می­شود و برای سیال بافر 0.34 میکرولیتر بر دقیقه که از ورودی 2 گزارش شده است. در میانه میکروکانال این دو جریان به هم می­رسند با توجه به علاقه اسپرم های متحرک برای شنا در مسیری با تغییرات غلظت و نفوذ و شنا به سمت سیال با غلظت کم، مقدار غلظت برای جریان بافر، صفر مول بر متر مکعب و برای نمونه اسپرم غلظت 1 مول بر متر مکعب در نظر گرفته شده است.

|  |
| --- |
|  |
| شکل 6 : تراشه طراحی شده توسط مقاله مرجع c: جهت ورودی جریان بافر b: جهت ورودی جریان اسپرم [6] |

اسپرم های فعال و متحرک با عبور از این تغییرات غلظت وارد مسیر بافر شده و به سمت خروجی C حرکت می­کنند و مطابق شکل 7 الف مشاهده می شود که غلظت در خروجی C افزایش داشته(به اندازه 0.22 مول بر متر مکعب)، همچنین سایر ذرات و اسپرم ها در مسیر مستقیم به سمت خروجی D حرکت می­کنند.

در شبیه سازی به کمک نرم افزار با استفاده از نرم افزار کامسول با شبیه سازی و تعریف پارامتر D ضریب پخش که در جدول 2 مقدار آن گزارش شده است بر اساس ویژگی­های یاد شده اسپرم­های متحرک شروع به نفوذ به بخش جریان بافر می­کنند. مطابق شکل 7

دو جریان در محل تلاقی دارای اختلاف غلظت می­باشند و مشاهده می شود در طول کانال میزان نفوذ جریان با غلظت بالا(حاوی اسپرم به جریان با غلظت پایین افزایش می یابد و در خروجی D مقدار غلظت افزایش یافته است.

|  |  |
| --- | --- |
| الف |  |
| ب |  |
| شکل 7: الف: تغییرات غلظت نمونه در خروجی  ب: نفوذ اسپرم با تغییر غلظت در محل تلاقی دو جریان[6] | |

در تراشه طراحی شده (شکل 1) ابتدا به بررسی استقلال حل از المان برای پروفیل سرعت در ناحیه بحرانی پرداخته می­شود. مطابق شکل 9 المان بندی های مختلف در راستای عمودی کانال با یکدیگر مقایسه شده اند، که برای پنج المان بندی مختلف توزیع سرعت رسم شده است، که این المان­ها شامل المان بسیار ریز، ریزتر، ریز، متوسط و درشت می­باشد.

|  |
| --- |
|  |
| شکل 8: ناحیه مشخص شده در راستای عمودی کانال برای بررسی پروفیل سرعت |

شکل 9 نشان دهنده ی این است که مولفه محوری سرعت (U) در دو المان بندی بسیار ریز و ریزتر تقریبا بر هم منطبق است. اختلاف مولفه­ی سرعت بین این دو المان بندی بسیار ریز و ریزتر در حدود 1.5 درصد است، که مشخص می­کند سرعت ها در این دو المان بندی مقدار نزدیکی به هم هستند. با توجه به اینکه هزینه محاسباتی کاهش یابد از المان ریزتر برای شبیه سازی استفاده می­شود.

|  |  |
| --- | --- |
| الف |  |
| ب |  |
| شکل 9: الف: توزیع سرعت در راستای عمودی کانال در 5 المان بندی مختلف  ب: نمای بزرگ شده قسمت الف | |

جدول 3 پنج نوع المان بررسی کرده برای ابعاد کلی تراشه را بر اساس تعداد المان­ها نشان می­دهد.

جدول3: پارامتر های هندسی چاه حرارتی

|  |  |
| --- | --- |
| نوع المان | تعداد المان ها  () |
| بسیار ریز(Extra fine) | 194.5 |
| ریزتر(Finer) | 59.2 |
| ریز (fine) | 19.1 |
| متوسط(Normal) | 9.3 |
| درشت(Coarse) | 2.7 |

**بحث روی نتایج**

با حل معادله­ی انتقال جرم پخش (9) و معادله­ی جریان همرفتی (10) کانتور غلظت تراشه طراحی شده به شکل 10 به­ دست می­آید، نفوذ جریان اسپرم به سمت خروجی­های 2 که برای اسپرم­های متحرک تعبیه شده، نشان دهنده تلاش اسپرم­های متحرک برای ورود به این کانال خروجی با عبور از جریان بافر است. تغییرات غلظت در محل تلاقی دو جریان بافر و اسپرم مشابه مقاله مرجع، به اندازه 0.25 مول بر متر مکعب است که مشخص می­کند بخشی از اسپرم­ها جریان را شکافته اند. خروجی 1 توانایی برگرداندن جریان به داخل کانال ورودی اسپرم را دارد در نتیجه هیچ اسپرم متحرکی از فرآیند جداسازی خارج نشده و از دست نمی رود. تغییر دبی ورودی بافر به مقادیر بیشتر از یک و نیم برابر دبی اسپرم، باعث نفوذ جریان اسپرم و ذرات دبری به خروجی های مورد نظر برای جداسازی اسپرم متحرک می­شود(خروجی 2)، در نتیجه شکافت جریان رخ نمی­دهد.

|  |
| --- |
|  |
| شکل 10: تغییرات غلظت در داخل خروجی 2 نشان دهنده نفوذ اسپرم |

در شکل 11 بردارهای سرعت برای محل تلاقی رسم شده است، حرکت رئوتاکسی اسپرم این اجازه را به اسپرم های متحرک می­دهد تا در خلاف جهت جریان بافر در دبی بهینه که توانایی شنا امکان پذیر باشد و به سمت کانال های سمت راست شنا کند.

کاهش سرعت در نزدیکی کانال های خروجی 2 باعث فعال سازی حرکت رئوتاکسی می­شود و در نتیجه ذرات به سمت خروجی منتقل می­شوند.

|  |
| --- |
|  |
| شکل 11: بردار های سرعت در محل تلاقی دو جریان |

برای ردیابی ذرات اسپرم متحرک که تحت تاثیر نیروی های پسا، برآ و نیروی دیفیوزوفورسیس می­باشند، از ذرات با قطر 5 میکرون که به سمت بافر حرکت می­کنند و به محل تلاقی دو جریان می­رسند استفاده می شود. مطابق شکل 12 ذرات در ثانیه 21 به این محل می­رسند و ذرات اسپرم با سرعت بالا توانایی عبور از این خلاف جریان و حرکت به سمت خروجی 2 را دارند و سپس بعد از جداسازی به انتهای کانال حرکت می­کنند. بخشی از ذرات در کناره دیواره کانال به سمت خروجی 1 می­روند که منجر به از دست رفتن اسپرم­های متحرک در این ناحیه می­شود. با استفاده از ویژگی شنا در کنار دیواره ها اسپرم های متحرک کناره خروجی 1 به سمت خروجی 2 حرکت می­کنند.

|  |
| --- |
|  |
| شکل 12:حرکت اسپرم در داخل کانال تحت تاثیر نیروها |

تغییرات غلظت تا زمان تماس دو جریان صفر می­باشد و در نتیجه نیروی پسا در طول مسیر بر ذره تاثیر می ­گذارد ولی با نزدیک شدن به محل شکاف با ایجاد غلظت متفاوت نیروی دیفیوزوفورسیس بر نیروی پسا غلبه کرده و باعث نفوذ اسپرم­ها به داخل جریان بافر می­شود. مطابق شکل 13 تاثیر نیروی دیفیوزوفورسیس در داخل میکروکانال مشاهده می­شود. در ابتدا با نزدیک شدن به خروجی 1 به دلیل تغییرات غلظت نیروی دیفیزوفورسیس بر سایر نیروها غلبه کرده و باعث حرکت گیری مشخص ذره می شود سپس با ادامه مسیر و رسیدن به خروجی مقدار نیروی دیفیوزوفورسیس افزایش می­یابد.

|  |
| --- |
|  |
| شکل 13: تاثیر نیروی دیفیوزوفورسیس بر یک ذره در حال حرکت در 21 ثانیه |

در مورد بررسی نوآوری تراشه طراحی شده، ابتدا از ویژگی های ذاتی اسپرم شامل شنا در خلاف جهت جریان، شنا در کنار دیواره، عبور از غلظت استفاده شده است، همچنین با استفاده از این روش ها منجر به جداسازی اسپرم ها با تمامیت DNA بالاتر می­شود. همچنین در شبیه سازی به صورت کامل رفتار ذرات در مسیر کانال بررسی شده است.

**نتیجه گیری**

در مطالعه انجام گرفته علاوه بر استفاده از ویژگی ذاتی اسپرم در شکاف جریان، شبیه سازی سه بعدی انجام گرفته است، ذرات با دبی 0.5 میکرولیتر بر دقیقه وارد تراشه می­شوند و تحت تاثیر نیروهای برآ، پسا، و دیفیوزوفورسیس قرار می­گیرند. در پژوهش های قبلی شبیه سازی عددی و همچنین تاثیر نیرو ها بر اسپرم مورد بررسی قرار نگرفته است همچنین زمان فرآیند جداسازی بسیار طولانی و درصد بازدهی کم گزارش شده است.

* استفاده از دو جریان مخالف علاوه بر کمک به جداسازی اسپرم های متحرک باعث می­شود وقتی اسپرم وارد جریان بافر می­شود با جهت جریان در خلاف مسیر خود مواجه می­شود که باعث می­شود اسپرم های متحرک با استفاده از ویژگی ذاتی خود یعنی شنا در خلاف جهت جریان به سمت خروجی­ هدایت شوند.
* دبی ورودی برای جریان بافر برابر 1.2 میکرولیتر بر دقیقه باعث عملکرد بهتر تراشه و حرکت اسپرم های متحرک به سمت خروجی 2 می­شود.

**مراجع و منابع**

[1] R. Nosrati *et al.*, “Microfluidics for sperm analysis and selection,” *Nat. Rev. Urol.*, vol. 14, no. 12, pp. 707–730, 2017.

[2] H. Y. Huang, H. T. Fu, H. Y. Tsing, H. J. Huang, C. J. Li, and D. J. Yao, “Motile human sperm sorting by an integrated microfluidic system,” *J. Nanomedicine Nanotechnol.*, vol. 5, no. 3, 2014.

[3] J. K. Wu, P. C. Chen, Y. N. Lin, C. W. Wang, L. C. Pan, and F. G. Tseng, “High-throughput flowing upstream sperm sorting in a retarding flow field for human semen analysis,” *Analyst*, vol. 142, no. 6, pp. 938–944, 2017.

[4] M. Zaferani, S. H. Cheong, and A. Abbaspourrad, “Rheotaxis-based separation of sperm with progressive motility using a microfluidic corral system,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 33, pp. 8272–8277, 2018.

[5] H. Y. Huang, P. W. Huang, and D. J. Yao, “Enhanced efficiency of sorting sperm motility utilizing a microfluidic chip,” *Microsyst. Technol.*, vol. 23, no. 2, pp. 305–312, 2017.

[6] C.Phiphattanaphiphop, K. Leksakul, and R. Phatthanakun, “A novel microfluidic chip‑based sperm‑sorting device constructed using design of experiment method,” *Sci. Rep.*, pp. 1–13, 2020.

[7] T. An, D. Lee, and B. Kim, “Gravity and rheotaxis based sperm sorting device employing a cam-actuated pipette mechanism,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 084101, no. August, 2019.

[8] M. Wu, H. Zhang, X. Zheng, and H. Cui, “Simulation of diffusiophoresis force and the confinement effect of Janus particles with the continuum method,” *AIP Adv.*, vol. 4, no. 3, pp. 0–9, 2014.

[9] A.A. Meisam Zaferani, Soon Hon Cheong, “Rheotaxis-based separation of sperm with progressive motility using a microfluidic corral system,” *Natl. Acad. Sci.*, pp. 1–6, 2018.