

M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Villamosmérnöki és Informatikai Kar
Elektronikus Eszközök Tanszéke

ALAKOS ELEMÉK SZÁMÁNAK MEGHATÁROZÁSA VÉRBŐL
LAB-ON-A-CHIP ESZKÖZBEN

Erényi András István

Kanev Konstantin

Rubics Vilmos

Konzulens:

Ender Ferenc

Egyetemi tanársegéd, BME-EET

BUDAPEST, 2012

Köszönetnyilvánítás

A szükséges hardver és szoftver eszközöket az Elektronikus Eszközök Tanszéke biztosította számunkra, melyekért ezúton szeretnénk köszönetet mondani.

Továbbá köszönjük konzulensünk, Ender Ferenc lelkiismeretes segítségét, hasznos észrevételeit, tanácsait, mellyel emelte munkánk színvonalát. Végül szeretnénk megköszönni Hantos Gusztávnak a fókuszáló chip rendelkezésünkre bocsátását és hasznos kritikáit. Illetve Juhász Lászlónak a laboratóriumi közreműködést.

Kivonat

A munkánk célja egy orvos-biológiai mérés automatizálásának megvalósítása egy *mikrofluidikai* mérési környezet segítségével. A vörösvértest szám fontos adat az orvosi diagnosztikában, tipikus példa lehet az anémia, azaz a vérszegénység felismerése, de irányadó paraméterként szerepel számos kórképben. A vörösvértest szám meghatározására manapság elterjedt módszer a Bürker kamra alkalmazása. Az eljárás amellett, hogy emberi erőforrást igényel, továbbá időigényes és pontatlan.

Automatizált megoldásoknál a vér-oldatot körülbelül $10\ \mu\text{m}$ nyílásban végződő kapilláris csőbe vezetik, így a vörösvértestek egyesével haladnak át, és egy speciális elektróda elrendezéssel az áthaladás detektálható. Az ilyen készülék legköltségesebb eleme ez a speciális kapilláris cső.

A feladatra alkalmas alternatívát nyújthat egy mikrofluidikai elven működő vörösvértest számláló berendezés. A mikrofluidika olyan folyadékmanipulációval foglalkozik ahol pár száz mikrométer átmérőjű csatornában áramoltatnak igen kis térfogatú folyadékokat. A csatornában a folyadékok mindig laminárisan áramlanak. A lamináris áramlás és kis geometriai méretek révén speciális elrendezésekben elérhető a vér alakos elemeinek darabonkénti obszerválása is.

Az általunk választott módszerben az ún. *hidrodinamikai fókuszálás* elvét használjuk fel. $10\ \mu\text{m}$ -es *virtuális* csatornát mikrofluidikai módszerekkel hozzuk létre. Az alakos elemek detektálását három módszerrel kíséreltük meg.

Abstract

The aim of our project is to automate a biomedical measurement by utilizing a microfluidic measurement environment. The number of red blood cells in the human blood is an important factor in medical diagnostics. A typical example is the anemia, but it is a governing parameter of other diseases as well. A common way to count red blood cells is the use of the „Bürker” chamber. Besides it requires human resources, this method is time-consuming, and also inaccurate.

In case of automated measurements the blood solution is flowing through a capillary tube which ends in a 10 μm aperture, thus the blood cells can pass through only one by one. In these applications the most expensive part of the device is this special capillary tube.

A red blood cell counter based on the principles of microfluidics is a suitable alternative. Microfluidics deals with the manipulation of fluids where the diameter of channels are in 100 μm range, therefore the volumes of the liquids are also very small. In these microchannels always laminar flow is developed. Because of the laminar flow and the small geometric dimensions as well, the blood can be observed in details in a special arrangement, therefore the observation of each figural element would be also possible.

The method we are utilizing called *hydrodynamic focusing*. The diameter of this focused beam – using the appropriate settings – is approximately 10 μm . In order to detect the figural elements we studied three methods.

Tartalomjegyzék

Kivonat	I
Abstract	II
1. Arányos méretcsökkentés hatásai folyadékoknál	1
1.1. Arányos méretcsökkentés hatásai	1
1.1.1. Reynolds-szám, diffúzió, Pécelet-szám	2
1.1.2. Hidrodinamikai fókuszálás	4
1.2. Citometria Lab-on-a-Chip eszközökben	5
1.2.1. A citometria szenzorai	5
1.2.2. Fénytorés detektálása	7
1.2.3. Fluoreszkálás	10
1.2.4. Fényelnyelés	11
1.2.5. Coulter számláló	13
1.2.6. A vér alakos elemei	13
1.2.7. Összefoglalás	14
2. Mérési környezet kialakítása	15
2.1. Mérőrendszer moduljai	16
2.1.1. Mérőasztal	17
2.1.2. Adatgyűjtő eszközök	17
2.1.3. Mikroszkóp	19
2.1.4. Hardvervezérlő egység	21
2.1.5. Mikrofluidikai chip	22
2.2. Mérésvezérlő szoftver tervezése	24
2.2.1. Forráskód	25
2.2.2. Kameranaszoftver	27
2.2.3. Mintavételi, adatgyűjtő algoritmus	29
3. Mérések és eredmények	31
3.1. Felhasznált eszközök és anyagok	31
3.1.1. Mérési elrendezés	31
3.1.2. Alkalmazott folyadékok	31
3.2. Mérési eredmények	32
3.2.1. Optimális áramlási ráták meghatározása	32
3.2.2. Vörösvértestek optikai tulajdonságainak módosítása	33
3.2.3. A hidrodinamikai fókuszálás szabályzása	33
3.2.4. Kísérleti mérések lézerrel	34
3.2.5. Kísérleti mérések kamera segítségével	36

3.2.6. Kísérleti mérések reflektált lézerfény hisztogramja alapján . . .	38
4. Konklúzió és továbblépési lehetőségek	41
A. Fényképek	V
B. CD melléklet tartalma	VII
Ábrák jegyzéke	X
Táblázatok jegyzéke	XI
Irodalomjegyzék	XIII

1. fejezet

Arányos méretcsökkentés hatásai folyadékoknál

Jelen Tudományos Diákköri dolgozatban a Tisztelt Olvasó egy gyorsan fejlődő tudományterület, a mikrofluidika egy gyakorlati alkalmazásába nyer betekintést. A megoldandó kérdés egy orvosbiológiai feladat megvalósítása mikrofluidikai környezetben. A dolgozatban egy a vér alakos elemeinek számlálására vonatkozó módszer eredményeit mutatjuk be.

A dolgozat elején a mikrofluidikához kapcsolódó alapvető fogalmakat tisztázzuk, ezt követi a fenti problémakör vizsgálatával foglalkozó nemzetközi irodalom eredményeinek áttekintése. Külön fejezet tartalmazza a mérési környezetet és a benne található eszközök ismertetését. Ezt követően ismertetjük az általunk elvégzett fejlesztési munkálatoakat, melyek segítségével a mérőrendszer alkalmassá vált a kitűzött feladat elvégzésére. Az általunk alkalmazott mérési módszert és az eredményeket külön fejezetben dolgozzuk fel.

A mikrofluidika mikro-nanométerű térfogatokban, csatornában történő folyadékmanipuláció, interdiszciplináris tudományterület. Villamosmérnöki, gépészeti illetve biológiai alapokra épít. A mikrofluidikai technika jelentős szerepet játszik az orvosi diagnosztika, mikrobiológiai kutatások, de például az integrált áramkörök hűtése területén is. A folyadékok viselkedése a mikro- nanoliteres térfogatokban eltérhet a makrométerű térfogatokban tapasztalható viselkedéstől. Az egyes folyadékokra jellemző fizikai tulajdonságok megváltoznak. Nehezebbé válnak a makroszkopikus méretekben egyszerű feladatok (transzport, hígítás, keverés, szétválasztás). Mikroszkopikus méretek esetén a makroszkopikus tartományban nehezebben észrevehető objektumok alkalmas módszert választva könnyen érzékelhetővé válnak [1].

1.1. Arányos méretcsökkentés hatásai

A mikrofluidika olyan tudományág, mely a méretcsökkentés okozta hatásokat tudatosan alkalmazza egy adott funkció megvalósítására. Az egyes fizikai hatások a méretcsökkentés következtében eltérő mértékben csökkennek, így olyan jelenségek is megfigyelhetők mikroszkopikus mérettartományban, amelyek makroszkopikus méretek között nem jöhetnek létre. Vegyük például egy test felület/térfogat arányát melyet a lineáris méretek alapján karakterizálunk. Az arányos méretcsökkentés hatására a felület l^2 -el csökken, míg a térfogat l^3 -el, lineáris méretei l^1 -el. Ez azt jelenti, hogy gyorsabban csökken a test térfogata mint a felülete, a felület/térfogat aránya tehát növekszik [2]. Például

ezért marad fent a szitakötő a víz felszínén. A makroszópikus tartományban a folyadékok felveszik a tárolóedény alakját. Míg mikrotartományban cseppalakot vesznek fel. Az 1.1. táblázat összefoglalja a mikrofluidikában fontos fizikai mennyiségeket, hogy a méretcsökkenés következtében milyen nagyságrendben változnak [1]. A d a távolság, míg l a lineáris méreteket függvényében jelöli a hatásokat. A mikrofluidikában a gra-

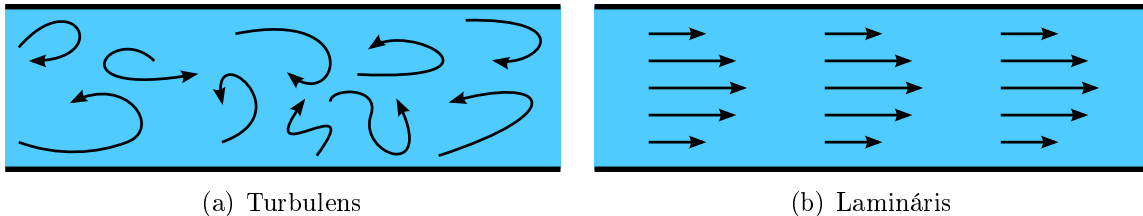
Fizikai mennyiség	Arányos méretcsökkentés
Van der Waals erő molekulák között	d^{-7}
Van der Waals erő felületek között	d^{-3}
Idő	l^0
Távolság	l^1
Kapilláris erők	l^1
Diffúziós idő	l^2
Elektrosztatikus erő	l^2
Térfogat	l^3
Tömeg	l^3
Gravitációs erő	l^3
Centrifugális erő	l^4

1.1. táblázat. Skálázási törvények

vitációs erőhatás elhanyagolható, a diffúziós idő nő, viszont jelentős a Van der Waals erő molekulák közötti hatása. Ez a domináns erőhatás okozza a cseppalak kialakulását a mikroszatonakban. A kapilláris erők a gravitációs erőhöz képest kisebb mértékben csökkennek, így szintén dominánssá válnak.

1.1.1. Reynolds-szám, diffúzió, Pécelet-szám

A folyadékok áramlására vonatkozó egyik fontos paraméter a Reynolds-szám. A Reynolds-szám a folyadékok mechanikájában az áramlásra jellemző dimenzió nélküli szám, mely a tehetetlenségi erők és a közeg belső súrlódása közötti viszonyszám. A mikrofluidikában alkalmazott eszközök geometriai paramétereinek mellett a Reynolds-szám általában száznál kisebb értékű, de nem ritka, hogy egy alá is csökken. A tapasztalatok szerint lamináris áramlás¹ akkor alakul ki, ha a Reynolds-szám értéke nem haladja meg a kétezret [4]. Ez azt jelenti, hogy a mikrofluidikai környezetekben az áramlás tekinthető tö-



(a) Turbulens

(b) Lamináris

1.1. ábra. Áramlástípusok

kéletesen lamináris jellegűnek. A turbulens áramlásra jellemző nyomás-fluktuáció nem

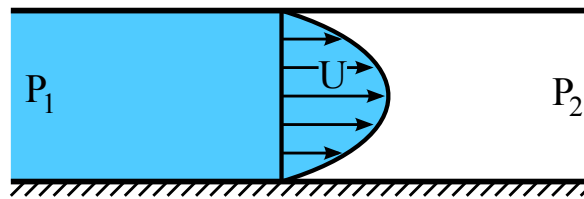
¹Laminárisnak nevezzük az áramlást, ha a közeg párhuzamos rétegekben áramlik. A részecskék mozgási iránya az áramlással párhuzamos, annak az áramlás irányára merőleges összetevője nincs.

lép fel, adott pontban a mért nyomás állandó. Adott geometriai paraméterekkel rendelkező csatornában a Reynolds-szám értéke,

$$\text{Re} = \frac{vD}{\nu} = \frac{QD}{\nu A} = \frac{vd_u}{\nu}. \quad (1.1)$$

A v a folyadék áramlási sebessége, D a csatorna hossza, ν a kinematikai viszkozitás², Q a térfogategységre eső átfolyási sebesség, A a csatorna keresztmetszetének a felülete, d_u pedig a hidraulikus átmérő³ [5].

A laminárisan áramló folyadékokra jellemző a réteges áramlás kialakulása. Nyomáskülönbség segítségével létrehozott áramlás során az egyes rétegek különböző sebességgel áramlanak. A mikrocatorna szélén áramló folyadékrétegre a csatorna fala fékező hatást fejt ki. A különböző folyadékrétegek egymáson elcsúszva a középvonal felé gyorsabban áramlanak. Az így kialakuló áramlási profil parabolikus, 1.2. ábra. Ennek következtében a statisztikai valószínűsége annak, hogy az alakos elemek a csatorna közepén áramlanak nagyobb [3]. Lényeges kérdés mikroméretű tartományokban a diffúzió. A diffúzió



1.2. ábra. Nyomáskülönbség segítségével létrehozott áramlás

anyagáramlási jelenség, melynek hajtóereje a sűrűségkülönbség. Az anyagáramlás sebessége a sűrűséggradienssel arányos. Ha különálló részecskék nagy sűrűségben vannak jelen, bár az egyes részecskék mozgása véletlenszerű (Brown-mozgás), mégis a részecskék összessége determinisztikusan viselkedik. Egyenletesen töltik ki a rendelkezésükre álló teret. A jelenséget Fick írta le matematikai formában,

$$J_n = -D \left(\frac{\partial C}{\partial x} + \frac{\partial C}{\partial y} + \frac{\partial C}{\partial z} \right) = -D \nabla C. \quad (1.2)$$

Ahol az anyagáramlás (J_n), a koncentráció (C) x, y, z irányban való változásával egyenesen arányos. D az anyagra jellemző diffúziós állandó. Fick második egyenlete azt mondja, hogy a koncentráció változás sebessége négyzetesen arányos az x, y, z irányú koncentrációváltozással, a rendszer entrópia maximumra törekszik,

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) = D \nabla^2 C. \quad (1.3)$$

Vegyünk példaként egy „T” elágazást, melybe két folyadékot vezetünk (1.3. ábra). Célunk az, hogy ezeket a folyadékokat tökéletesen összekeverjük. A kérdés, hogy ehhez milyen hosszban kell vezetnünk a két folyadékot a T elágazásban. A két folyadék diffúzió hatására a csatorna mentén el kezd keveredni, a már keveredett folyadék tartomány szélességét jelölje δ . Növekedésének mértéke gyökösen arányos a diffúziós állandó és az

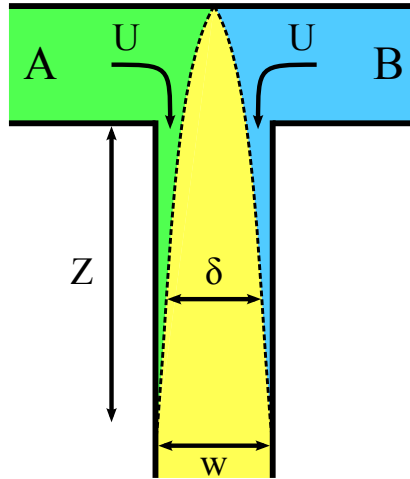
²A víz kinematikai viszkozitása $10^{-6} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$.

³Téglalap alakú cső hidraulikus átmérő ekvivalense, $d_u = \frac{2ab}{a+b}$.

idő szorzatával, $\delta \sim \sqrt{Dt}$. A két folyadék akkor lesz tökéletesen homogén, ha a ez az érték csatornaszélességnyi lesz ($\delta = w$). Az ehhez szükséges idő $\tau_D \sim w^2/D$. Ez idő alatt természetesen a folyadékok megtettek valamekkora távolságot, melynek mértéke $Z \sim Uw^2/D$. Jelen példában a teljes keveredéshez szükséges csatornahosszok száma arányos az úgynevezett Pécelet-számmal.

$$Pe = \frac{Z}{w} = \frac{Uw}{D}. \quad (1.4)$$

A képlet alapján kiszámolható, hogy egy $40 \mu\text{m}^2/\text{s}$ diffúziós állandóval rendelkező



1.3. ábra. Folyadékok keveredése „T” elágazásban

fehérjének, mely egy $100 \mu\text{m}$ -es csatornában $100 \mu\text{m}/\text{s}$ sebességgel halad, körülbelül 250-szer kell megtennie a $100 \mu\text{m}$ -t. A homogén keveredés tehát körülbelül 4 percet vesz igénybe [7].

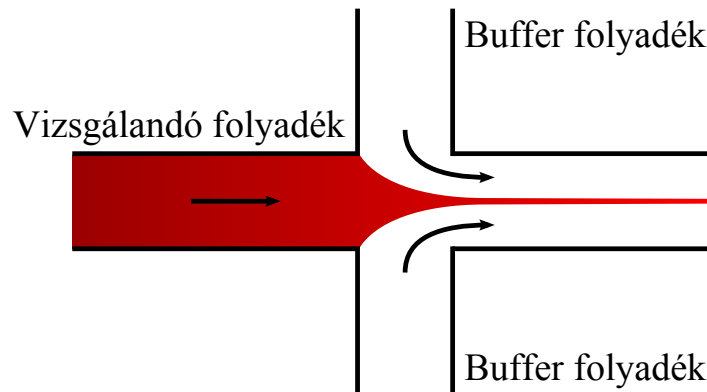
1.1.2. Hidrodinamikai fókuszálás

Sejtszámlálásra használhatóak olyan eljárások, melyek néhány mikrométer⁴ keresztmetszetű csatornákon átáramló folyadékban található alakos elemeket, lézersugárral vagy elektromos vezetőképesség mérésével detektálják. A mai technológiai korlátok mellett körülményes és drága ekkora átmérőjű csatornát kialakítani.

A hidrodinamikai fókuszálás megoldást jelenthet erre a problémára. A szükséges keresztmetszetű csatornát párhuzamosan áramló folyadék rétegek segítségével hozza létre. A detektálandó elemek keresztmetszetéhez képest viszonylag nagy méretű csatornába vezetjük a vizsgálandó sejteket tartalmazó folyadékot. Két oldalról buffer folyadékot – például desztillált vizet – áramoltatunk hozzá. Az ilyen módon létrehozott rendszerben jellemzően a Reynolds szám értéke alacsony. A különböző folyadék rétegek nem keverednek, hanem párhuzamosan áramlanak. A vizsgálandó folyadékot egy vékonyabb csatornába kényszerítik. Csupán az egyes folyadékrétegek felületéhez nagyon közel alakulhat ki diffúzió. A két folyadék diffúzió általi keveredésének időállandója lényegesen nagyobb, mint az az idő amit a két folyadék a „T” elágazás közelében tölt (megfelelően megválasztott áramlási ráták esetén). Ezáltal a „T” elágazás közelében a diffúziós

⁴A használt csatorna keresztmetszete a vizsgálandó alakos elem legnagyobb keresztmetszetének nagyságrendjébe esik.

hatás gyakorlatilag elhanyagolható. A két különböző folyadék nem keveredik, ezáltal a középső folyadék látszólag egy jóval keskenyebb csatornában áramlik. lásd a 1.1.1. fejezet példáját illetve a [8]-t. Abban az esetben, ha a fókuszált folyadéksugár átmérője például a vörösvértestek méretével összemérhető, az áramló folyadékban ható inerciaerők a vörösvértesteket egymás mögé, sorba kényszerítik. Ez a jelenség az alapja az általunk megvalósítandó mérési eljárásnak, ekkor ugyanis lehetővé válik a vörösvértestek egyenkénti obszerválása. Az imént bemutatott módszer elengedhetetlen az általunk megvalósítandó sejtszámlálási eljárás megvalósításához. A 1.4. ábrán a két-dimenziós hidrodinamikai fókuszálás egyszerű illusztrációja látható.



1.4. ábra. Két-dimenziós hidrodinamikai fókuszálás

1.2. Citometria Lab-on-a-Chip eszközökben

A citometria a biológia és az orvostudomány egy fontos vizsgálati eszköze. Célja mindig valamilyen folyadékban lévő alakos elemek megszámlálása, elkülönítése, vagy egyéb tulajdonságainak meghatározása. Általában hidrodinamikai fókuszálást alkalmazva olyan keresztmetszetű látszólagos csatornát alakítanak ki, hogy a vizsgálandó folyadékban levő sejtek csak egyesével tudjanak áthaladni rajta. Az ilyen módon létrehozott csatornát monokromatikus fényforrással – ez többnyire lézer – megvilágítva azt vizsgálják, hogy mi történik a csatorna vizsgált térrészen áthaladó és onnan kilépő fényvel. A következőkben röviden áttekintjük a citometriával foglalkozó szakirodalom eredményeit. Kitérünk a detektálás módszereire és fizikai megvalósításukra.

1.2.1. A citometria szenzorai

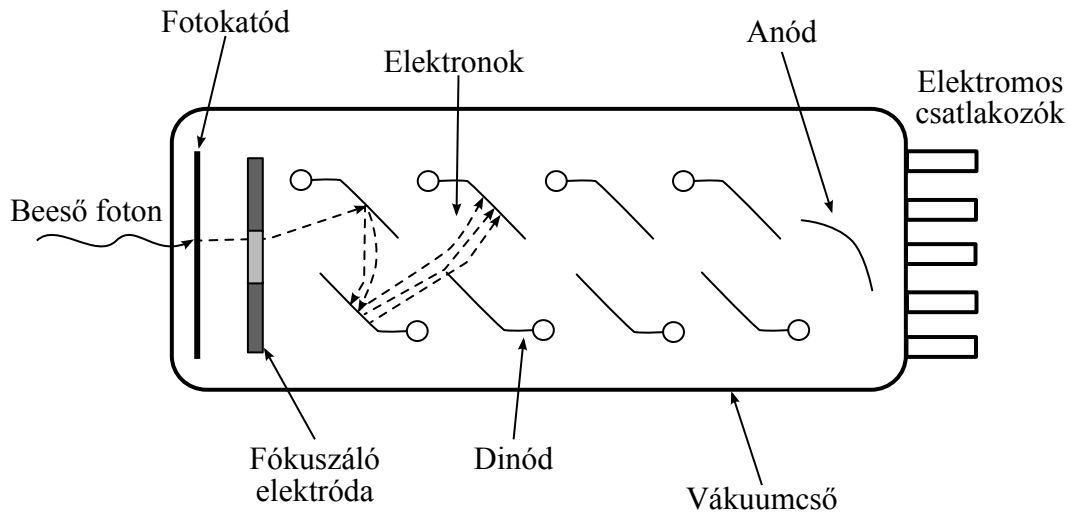
Fotoelektron sokszorozó

A fotoelektron sokszorozó⁵, a továbbiakban PMT, egy olyan vákuumcső, mely rendkívül érzékeny az ultraibolya (200 – 390 nm), a látható (390 – 750 nm), és az infravörös tartományokban (750 – 1000 nm). A beérkező fény okozta áramot akár százmillió szorosára képes felerősíteni, így nagyon kis intenzitású fényjel – akár egy darab foton jelenléte – detektálható segítségével. Működése a fényelektromos jelenségen alapszik. A megfelelő hullámhosszal – tehát megfelelő energiával – rendelkező foton, képes kiütni

⁵Photomultiplier Tube

egy elektront a megvilágított anyagból. Az így létrejövő áram mérhető. A jel drasztikus felerősödését a másodlagos kibocsájtás okozza. Ennek során a fotoeffektus által kibocsájtott elektron további elektronokat üt ki a helyükről. A jelenség hamar nagy fluxusú elektronáramlást, tehát jól mérhető áramot eredményez.

A szenzor működésének a vázlatja az 1.5. ábrán látható. A bejutó fotonok elektronokat ütnek ki, a fényelektromos hatásnak megfelelően. Az elektronokat egy fókuszáló elektróda segítségével az első dinódára irányítják. Az egymást követő dinódáknak egyre magasabb az elektromos potenciálja, így az egyikből kilépő elektron gyorsulva jut a következőhöz. A felgyorsított elektronok egyre több elektront ütnek ki az egyes dinódákból (másodlagos emisszió), felerősítvén így a jelet.



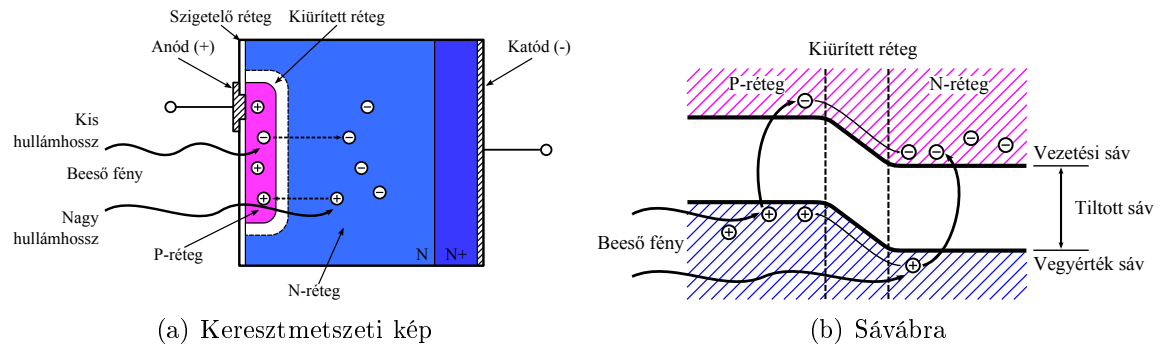
1.5. ábra. Fotoelektron szorzó működésének vázlatja

Fotoelektron szorzók kiváltására elterjedt módszer a PIN dióda alkalmazása. A PIN dióda egy olyan dióda melyben széles, enyhén adalékolt – közel intrinsic – félvezető található a p és az n átmenet között. Működés közben az intrinsic tartományban rendkívül nagy télerősség uralkodik, mely felgyorsítja a töltéshordozókat a p-ből az n tartomány felé, ezzel lehetővé téve felhasználását nagyfrekvenciájú alkalmazásokban. A PIN diódákat legtipikusabban valamilyen szcintillátor kristály után helyezik, foton-elektron átalakítás céljából. A PIN dióda használatának előnyei, hogy nem igényel nagy tápfeszültséget és érzéketlen a mágneses mezőre. Azonban nincs belső erősítése, mint a PMT és lavina dióda eszközöknek [9].

Fotodióda

A PMT helyett gyakran alkalmaznak fotodiódát. A fotodióda kis behatolási mélységű p-n átmeneteket tartalmaz, melyet záró irányban kell előfeszíteni. A beeső fotonok elektron-lyuk párokat keltenek, amelyek áthaladva a kiürített rétegen fotoáramot eredményeznek. Ez látható a 1.6(a) ábrán, ami egy fotodiódát ábrázol keresztmetszetben. A 1.6(b) ábrán a dióda sávszerkezete látható. Az alsó kékekkel sraffozott rész a vegyérték sáv, a felső lila pedig a vezetési sáv. A fehérrel ábrázolt rész az úgynevezett tiltott sáv. Hogy töltéshordozó jusson a vezetési sávba, akkora energiájú fotonnak kell becsapódni, melynek energiája nagyobb a tiltott sáv szélességénél. A fotodiódákat leggyakrabban fénytörésből származó, rövid- és kis intenzitású jeleket vizsgálatához használják. Legfontosabb tulajdonságuk a gyorsaságuk és az érzékenységük.

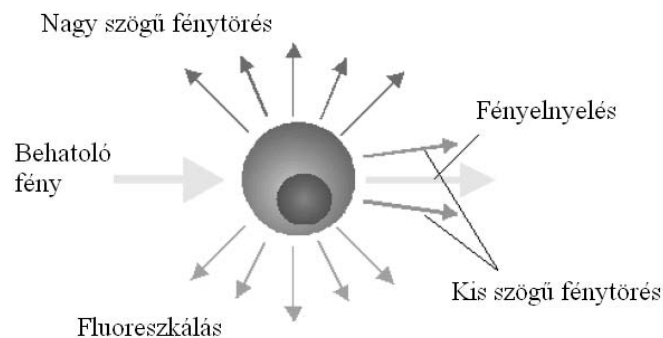
Citometriai alkalmazások esetén általában lavina⁶ fotodiódákat – a továbbiakban APD – szoktak alkalmazni. Ha a p-n átmenet struktúrája olyan, hogy a generált elektronlyukpárok ütközési ionizáció révén újabb töltéshordozókat képesek létrehozni, akkor lavina fotodiódáról beszélünk. A lavinamechanizmus erősen megnöveli az eszköz fényérzékenységét [10].



1.6. ábra. Fotodióda működésének vázlata

1.2.2. Fénytörés detektálása

Fénytörés detektálásánál a mikrocsonnában áramló sejt tulajdonságairól a visszaverődő fény szöge és intenzitása hordozza az információt. A fénytörésnek két főbb fajtája van. A kis szögű törés ($0,5^\circ - 5^\circ$) a sejt méretétől, és áthatolhatóságától függ, míg a nagy szögű törés ($15^\circ - 150^\circ$) a felület érdességétől, a sejt felépítéstől, anyagi összetételével van kapcsolatban. Az 1.7. ábra. a fénytörés során nyerhető információkat foglalja össze.

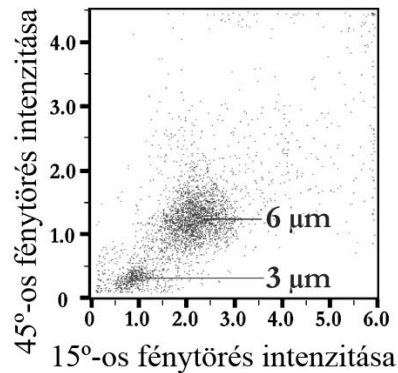


1.7. ábra. Citometria által vizsgált fényjelenségek[13]

Nagy szögű törést vizsgáltak Pamme és társai munkájuk során [11]. HeNe lézerrel megvilágítottak egy hidrodinamikailag fókuszált keskeny csatornát. A lézer 632,8 nm hullámhosszú 5 mW teljesítményű fényt bocsájtott ki. Vizsgálatukhoz két szögből – 15° és 45° – detektorokat állítottak fel egy forgatható állványzatra, melyekkel a fényszóródást figyelték. Méréseiket különböző méretű latex gyöngyökön végezték. Azt tapasztalták, hogy a megtört fény intenzitása arányos a gyöngyök térfogatával (átmérőjével). A

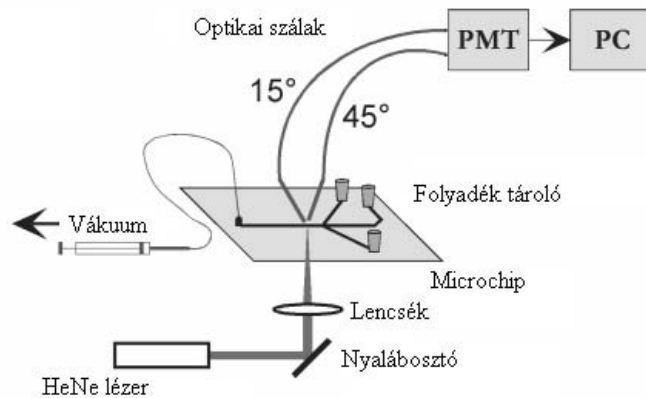
⁶Avalanche photodiode

nagyobb átmérőjű gyöngyök nagyobb intenzitású fénytörést okoztak. Mérési eredményeik az 1.8. ábrán láthatóak. Pamme és társai az 1.9(a) ábrán látható mérési elrendezést

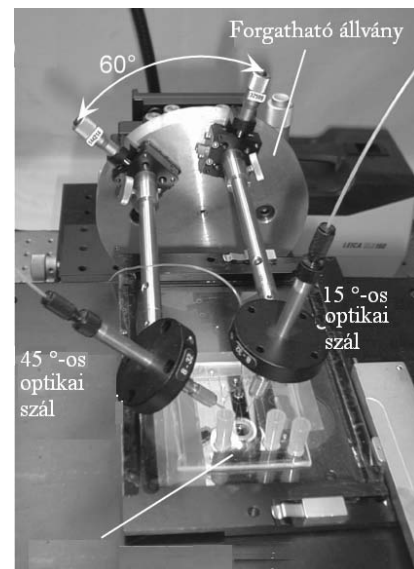


1.8. ábra. 15° és a 45°-os szögekben megtört fény intenzitásának ábrázolása a 6 és 3 μm átmérőjű részecskékre[11]

zést használták. A vákuum pumpa a csatornarendszer végén „húzza” a vizsgálandó- és a fókuszáló (buffer) folyadékot. Ez praktikus elrendezés, mert a folyadék manipulációhoz csupán egy pumpára van szükség, azonban a fókuszált sugár pozíciójának befolyásolására így nincs lehetőség. A HeNe lézert egy fénytörő és egy objektív segítségével a csatornára fókuszálják. A detektorok által érzékelt fényjeleket két optikai szálon keresztül egy PMT-be vezetik. A mért adatokat számítógép segítségével dolgozzák fel.



(a) Mérési elrendezés

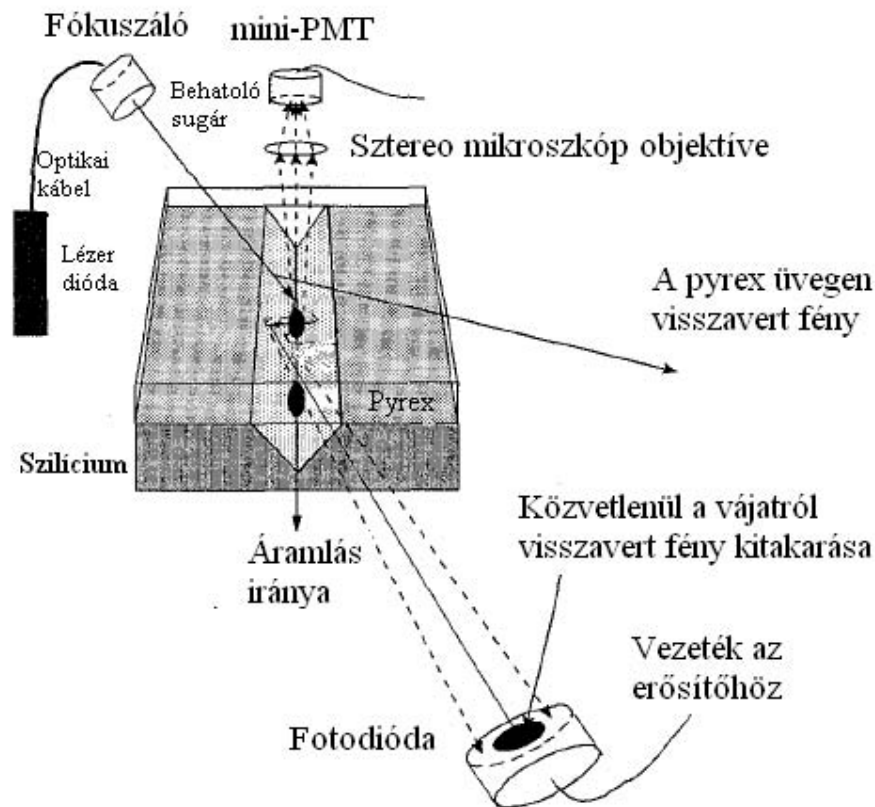


(b) Detektorok beállításához használt forgatható állványzat

1.9. ábra. Pamme-féle mérés[11]

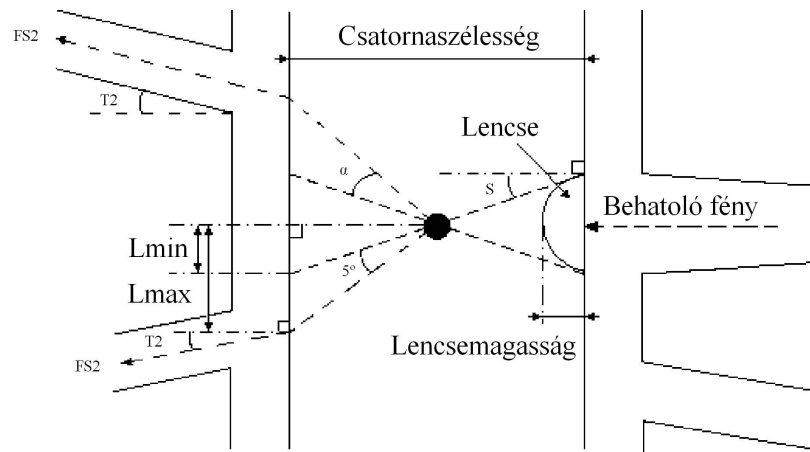
Altendorf és társai munkájuk során szintén a lézert fény sejteken való szóródását figyelték [12]. Különbség viszont, hogy nem alkalmaztak hidrodinamikai fókuszálást és latex gyöngyök helyett vörösvértesteket vizsgáltak. Egy szilícium hordozóra fotorezisztivel vitték föl a mintát, majd kémiai maratással hoztak létre egy „V” alakú vájatot. A

„V” alak az anizotróp marás következménye, szélessége a csatorna tetején 20 – 25 μm . Végül az így létrehozott struktúrát letakarták egy üveg fedőlappal. Megvilágítására egy 4 mW teljesítményű, 638 nm hullámhosszú diódalézert használtak. Az áthaladó vörösvértettek a fényt $2^\circ - 8^\circ$ -os szögekben törték meg. Ezt a kis szögű fénytörést fotodiódával detektálták. Annak érdekében, hogy csak a megtört fény jusson el a diódához, a közvetlenül a vájatról tükröződő fényt kitakarták. A nagy szögű fénytörés érzékelésére PMT-t, egészen pontosan mini-PMT-t használtak fel. Az 1.10. ábrán látható mérési elrendezésben a lézerdióda fényét optikai kábellel a fókuszálóba vezetik. A fókuszált sugarat ráirányítják a csatornára, a fekete foltok a vörösvértettek jelölik. A fotodiódát csatorna alá helyezték el, mely a kis szögű fénytörést vizsgálja. Annak érdekében, hogy csak a megtört fényt érzékeljék, a közvetlenül a diódára törés nélkül jutó fényt kitakarták. A nagy szögű fénytörés okozta jeleket egy lencsével összegyűjtve mini-PMT segítségével érzékelték. A fedőüvegről visszaverődő fény nem jutott az érzékelőbe, így nem okozott gondot.



1.10. ábra. Az áthaladó vértettek megvilágítják, fotodiódával a kis szögű, mini-PMT-vel a nagy szögű fénytörést vizsgálják[12]

Wang és társai szintén a kis- és nagy szögű fénytörés tulajdonságait vizsgálták [13]. Céljuk egy olyan mikrofluidikai áramlási citométer létrehozása volt, melyben az optikai mérőrendszerhez tartozó elemek integráltak és mind a két fajta fénytörést képes vizsgálni. Kis- és nagy szögű fénytörés esetében egyaránt PMT-t használnak detektorként, egy 632,8 nm hullámhosszúságú HeNe lézer alkalmaztak fényforrásként. A megvilágító és a visszaverődő fényt optikai szálak segítségével vezették. Az összes optikai elemet, a mikrofluidikai rendszert, valamint az optikai szál és hullámvezető közötti összekötte-



1.11. ábra. Fényjelek alakulásának elméleti vázlata[13]

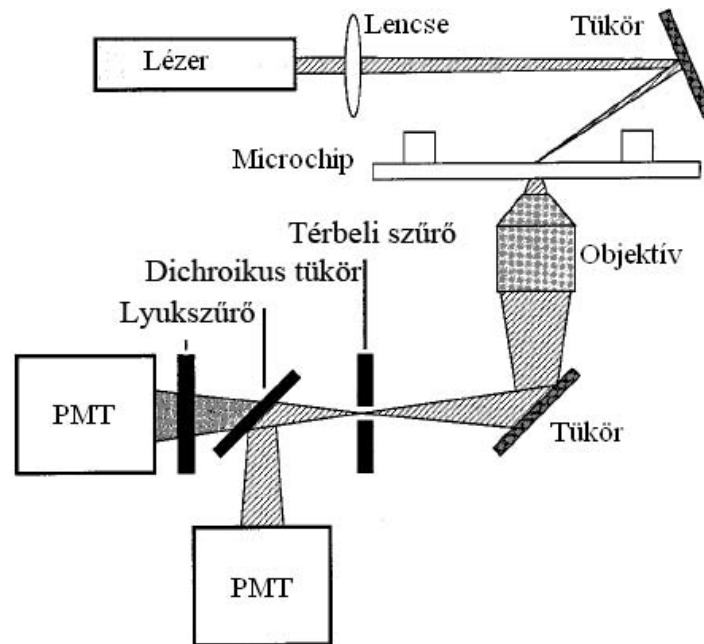
téseket, egyetlen polimer (SU-8 negatív fotoreziszt) rétegen alakították ki. A beérkező fény a kiszélesedő hullámvezetéből érkezik. Egy lencse a csatorna közepére fókuszálja a fényt, ahol áthaladnak a részecskék. A csatorna kiszélesedésére azért van szükség, mert így a csökkenthető a fény diszperziója, ugyanis ilyenkor a fénysugarak párhuzamosan haladnak. A bejutó fényvel szembeni oldalon levő hullámvezető a detektorhoz továbbítja a kis szögű fénytörés következtében létrejövő fénysugarakat.

1.2.3. Fluoreszkálás

Fluoreszkálásnál a megvilágított sejt elnyeli a fény egy részét amivel megvilágították és más hullámhosszon kibocsátja azt. Hátránya, hogy nem minden esetben alkalmazható. Olyan esetekben amikor alkalmazható, akkor például a csatornában áramló többféle sejt megkülönböztethető és számlálható segítségével. Bizonyos esetekben a szétválasztásukra is van lehetőség. A módszert gyakran alkalmazzák fénytörési mérésekkel kiegészítve.

A berendezés, melyet Schrum és társai fejlesztettek, egyaránt alkalmas fénytörés és fluoreszkálás vizsgálatára [14]. Mindkét esetben egy-egy PMT látja el az érzékelési feladatot. Fényforrásnak egy 488 nm hullámhosszúságú, 10 mW teljesítményű argonion lézert alkalmaztak. Mérőrendszerük különlegessége, hogy elektrokinetikai fókuszálást alkalmaz a szűkebb csatornaátmérő kialakításához. Ez azt jelenti, hogy nem pumpák segítségével juttatják be a mintát és buffer folyadékot, hanem elektromos tér használatával. Azon feszültségforrásokat melyek a folyadékadagolást vezérelték, egy a National Instruments által gyártott I/O kártya által, LabVIEW szoftver használatával valósították meg. Az I/O kártyát a továbbiakban is felhasználták a PMT-k jeleinek digitalizálására. Magát a vizsgálatokhoz használt Lab-on-a-Chip eszközt fotolitográfiával és nedves kémiai maratással hozták létre. A lézerből érkező fényt fókuszálták, majd egy tükörrel a chipre irányították. A chip alatti mikroszkóp objektív összegyűjtötte a fénytörés és fluoreszkálás okozta fényjeleket és továbbította egy tükörre. Ezt szűrik, majd egy nyalábosztó – dichroikus tükör – segítségével elválasztják a fluoreszkálásból és a fénytörésből származó jeleket. A fluoreszkálás jeleit még egyszer szűrik, majd a kétféle jelet eljuttatják a két PMT-hez.

Szintén sokoldalú eszköz a [15] cikkben bemutatott mérőrendszer, lásd az 1.13 ábrát. A fluoreszkálást és a fénytörést egyaránt hasznosítja. A kétféle vizsgálat detekto-



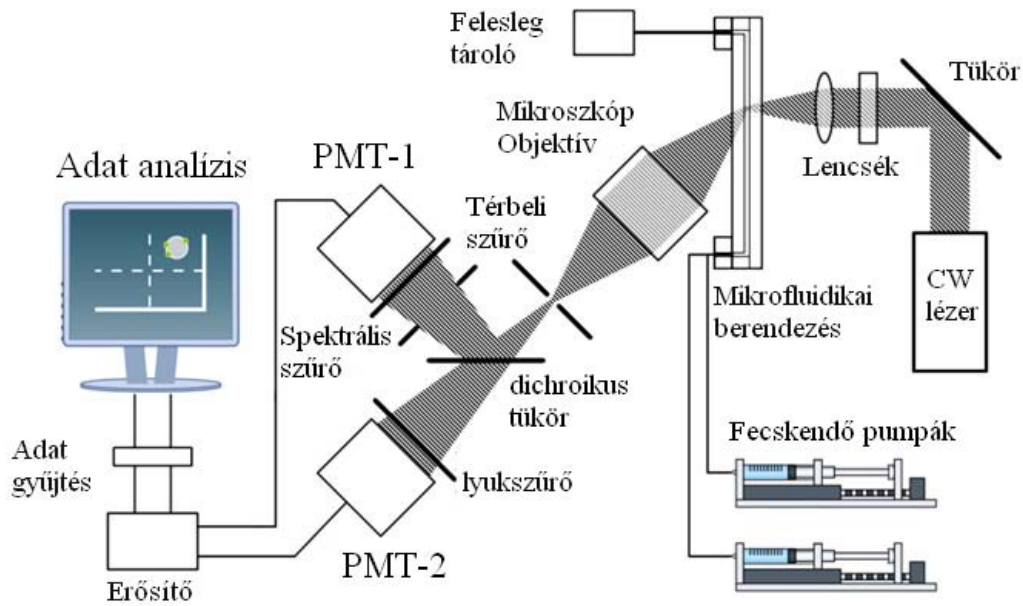
1.12. ábra. A lézert fényt a chipre juttatják, majd elválasztják egymástól a fluoreszkálás és fénytörés fényjelet[14]

ráként egy-egy PMT-t alkalmaztak. A készülék működőképességét latex gyöngyökön és baktériumok tesztelték. A gyöngyök közül a fluoreszkáló anyaggal jelöltek átlagosan $1,013 \mu\text{m}$ és $1,9 \mu\text{m}$ keresztmetszetűek voltak. A jelöletlenek $0,989 \mu\text{m}$ és $2,077 \mu\text{m}$ -es keresztmetszettel rendelkeztek. Fényforrásnak egy 50 mW teljesítményű, 488 nm hullámhosszú szilárdtest lézert használtak, melynek fényét ellipszis alakúra fókuszálták, a tengelyek hosszát $10 \mu\text{m}$, és $20 \mu\text{m}$ -re választották. A lézert fényt hidrodinamikailag fókuszált csatornára irányították. A csatorna fókuszálásához két pumpát alkalmaztak. Az egyik pumpa a buffer folyadékot, a másik pumpa a mintát juttatja a rendszerbe. Az áthaladó fényt mikroszkóp segítségével vizsgálták. Dikróm tükör segítségével különítették el a fluoreszkálásból és a fénytörésből származó fényjeleket. A két PMT által érzékelt jeleket erősítés után számítógép segítségével dolgozták fel. A fénytörés és a fluoreszkálás adataiból könnyen különválasztható a kétféle átmérőjű minta. A kisebb átmérőjű, jelölt gyöngyök, kisebb mértékű fénytörést, de nagyobb fluoreszkálásból származó jelet szolgáltatnak. Míg a nagyobb átmérőjű, jelöletlen gyöngyök, nagyobb fénytörésből és kisebb fluoreszkálásból származó jelet biztosítottak.

1.2.4. Fényelnyelés

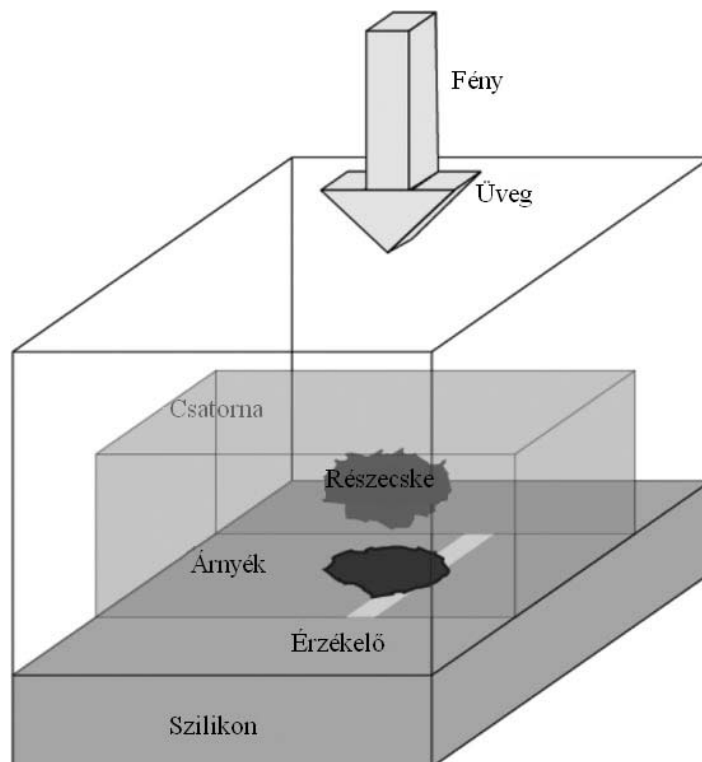
Fényelnyelés esetében a sejteket ismét csak egy fényforrással világítjuk meg, a detektort úgy állítjuk fel, hogy a fény közvetlenül érje, vagy legalább is egy optikai szál közbeiktatásával. Ilyenkor arra építjük érzékelési stratégiánkat, hogy az áthaladó sejtek a fényt kitarják és részben, vagy egészben abszorbeálják, illetve megtörik. Vagyis az áthaladó fény intenzitásának csökkenését okozzák mindkét esetben. A fotodióda árama függ az elnyelődés mértékéről.

A [16] cikk által ismertetett elrendezésben a csatornában haladó részecskéket felülről megvilágítják és közvetlenül a csatorna alá helyezik a detektorokat. Az első, egy össze-



1.13. ábra. Mu és társai által, fénytörés és fluoreszkálás detektálására kifejlesztett mérőrendszer[15]

sen negyven darabból álló, két soros és húsz oszlopos fotodióda-mátrix, a másik pedig két hosszúkás (úgynevezett szalag) fotodióda. Az áthaladó részecske kitararja a fényt,



1.14. ábra. Merőleges megvilágítású mikrocsatorna vázlat[16].

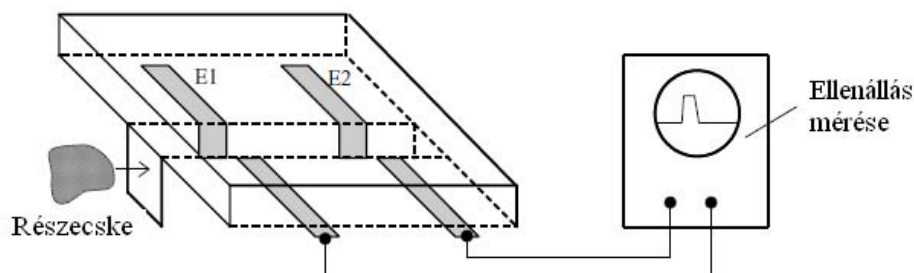
így a diódák nem vezetnek. A hosszúkás diódák összáraramából következtetni lehet a részecske szelességére. Ezzel a megoldással nem csak méret, hanem alaki információk is

nyerhetők. Fontos, hogy a diódák igen közel legyenek elhelyezve a csatornához, ugyanis az úgynevezett Fresnel-zónán belül a fényszóródás még nem olyan jelentékeny, ezért a részecske árnyéka pontosan olyan alakú és méretű mint maga a részecske.

1.2.5. Coulter számláló

Az eddig bemutatott módszerekkel a sejteket optikai úton detektálták. A Coulter-számláló a sejtek detektálását impedanciamérés segítségével végzi. A mikrocsatorna – melyben a detektálandó sejtek haladnak – két oldalára egy-egy elektródát helyeznek el. A csatornában áramló részecskék megváltoztatják a két elektróda között mérhető impedancia nagyságát, ezáltal érzékelhető, hogy áthaladt-e részecske az elektródák közt.

Koch és társai cikkükben saját Coulter számlálójukkal végzett méréseiket mutatják be [17]. A szilícium hordozóba belemarták a csatornát, majd leválasztottak egy fémréteget, ezzel létrehozva a csatorna két oldalán az elektródákat. Az egészet Pyrex üveggel⁷ fedték le. Ezzel a berendezéssel elméleti számítások alapján egy közelítőleg gömb alakú, $1,5 \mu\text{m}$ sugarú részecskével számolva, az elektródák közötti relatív ellenállás esés körülbelül 1,8%.



1.15. ábra. Coulter számláló sematikus ábrája az áthaladó részecske okozta ellenállás változás kimutatására[17]

1.2.6. A vér alakos elemei

A vér az emberi szervezet egyik fő testnedve, egy felnőtt ember testében körülbelül öt liter található. Fontos szerepei közé tartozik például az oxigén és széndioxid, illetve a tápanyag szállítás. Az emlősök vére alapvetően azonos felépítésű⁸. Az emberi vért alkotó alakos sejtek és átlagos értékeik felnőtt ember egy mikroliter vérére vonatkozóan: vörös vértestek (4 – 5 millió darab), fehérvértestek (4 – 10 ezer darab), vérlemezkék (150 – 400 ezer darab). Ezen értékek életkori, nemi, és testalkati különbségeket is mutatnak, sőt a tengerszint feletti magasságtól is függnnek. A vér további alkotó eleme a vérplazma, melynek 90%-a víz, és 10%-a oldott ionokból és szerves molekulákból áll[19][20]. A kísérlet során fontos, hogy biztosak legyünk benne, hogy az alakos elemek közül valóban a vörösvértesteket számláljuk. Ezek átlagos átmérője $7 - 8 \mu\text{m}$. A fehérvérsejteket alapvetően három csoportba sorolhatjuk: granulociták (átlagosan $9 - 12 \mu\text{m}$), monociták ($20 \mu\text{m}$), limfociták ($6 - 7 \mu\text{m}$). A vérlemezkék jóval kisebbek ($2 -$

⁷A Pyrex üvegyártó cég, mely laboratóriumi célokra gyárt bórszilikát alapú eszközöket, edényeket.

⁸Kísérleteink során birka vért használtunk, mely alvadás ellen kezelve volt.

5 μm), azok nem okoznak problémát[21]. Hogy optikailag könnyebben detektálhatóak legyenek a vörösvértetek, Hayem-oldattal kezeltük a mintát, így a vörösvértetek (és csak a vörösvértetek) optikailag sűrűbbé váltak. (A fehérvértetek megjelölésére egy másik oldatot, ún. Türk-oldatot használnak, mely feloldja a vörösvérteteket.)

1.2.7. Összefoglalás

A 1.2.2. fejezetben bemutatott érzékelési módszereket a megtört fény okozta rövid jelek detektálására használják többségében. Jelen alkalmazásban az áthaladó fény intenzitás változásából kívánunk következtetni az áthaladó vörösvértetek számára. Az intenzitás változást egy szilícium fotodióda segítségével kívánjuk mérni. Ugyan nem hoz létre olyan mértékű erősítést mint a PMT vagy az APD, de az áthaladó fény intenzitásának méréséhez ez nem is feltétlenül szükséges. Mivel a szakirodalom tanulmányozása során azt tapasztaltuk, hogy megvilágításra általában lézert használnak, ezért méréseink során mi is lézert használunk a csatorna átvilágítására.

Amennyiben a koncepciónk sikertelennek bizonyul, alternatívaként két másik módszerrel próbálunk sejteket detektálni. A mérőrendszerben egy kamerával a hidrodinamikai fókuszálás szabályozását segítjük. A kamera élő képén alakfelismerést végzünk, amivel az áthaladó sejteket detektálhatjuk. A vizsgalat során a vert hígítani fogjuk, illetve egy speciális oldattal megnöveljük a vörösvértetek optikai denzitását.

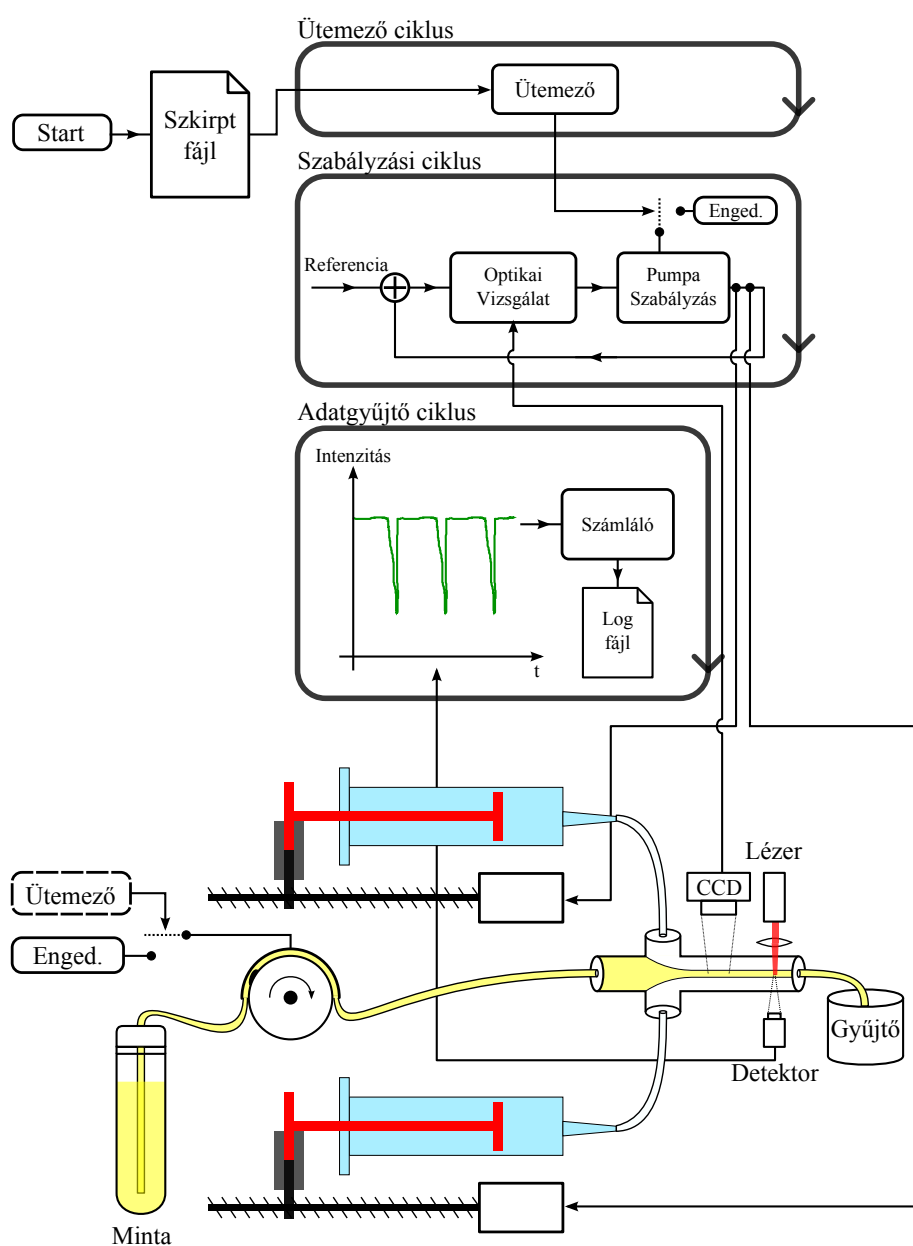
A másik alternatívánk szintén a kamera képét használja fel. A kamera képeről hisztogram készíthető, mellyel a szürkeárnyaltos kép intenzitás változása követhető. Az optikailag sűrített vér nagy változást okoz a hisztogramban, így számlálásra megfelelő alternatívát nyújthat.

Szerzők	Pamme [11]	Altendorf [12]	Wang [13]
Vizsgálat	fénytorés	fénytorés	fénytorés
Detektor	PMT	fotodióda és mini-PMT	PMT
Információ	sejt méret és szerkezet	sejt méret és szerkezet	sejt méret és szerkezet
Lézer	HeNe, 632,8 nm	Dióda, 638 nm	HeNe, 632,8 nm
Csatorna kialakítása	Hidrodinamikai fókuszálás	V-vájat	Hidrodinamikai fókuszálás
Szerzők	Schrum [14]	Mu [15]	Nieuwenhuis [16]
Vizsgálat	fénytorés, fluoreszkálás	fénytorés, fluoreszkálás	fényintenzitás
Detektor	PMT	PMT	APD sor
Információ	sejt méret és szerkezet	sejt méret és szerkezet	méret és alak
Lézer	Argonion, 488 nm	Szilárdtest, 488 nm	LED, 587 nm
Csatorna kialakítása	Elektrokinetikai fókuszálás	Hidrodinamikai fókuszálás	Hidrodinamikai fókuszálás

1.2. táblázat. Irodalomkutatást összefoglaló táblázat

2. fejezet

Mérési környezet kialakítása



2.1. ábra. Az automatikus diagnosztikai berendezés rendszerterve

Az általunk megtervezett automatikus sejtszámlálási feladatot ellátó diagnosztikai berendezés rendszerterve a 2.1. ábrán látható. A 1.1.2. fejezetben ismertetett hidrodinamikai fókuszálás segítségével kívánjuk előállítani azt a csatornaméretet¹, melyben a detektálandó vörösvértestek egyenként haladnak át. Ezt három *foliadékadagoló/fecskendő pumpával* és egy *speciális mikrofluidikai chip* segítségével kívánjuk elérni. Két pumpát használunk a buffer folyadék adagolására, míg a harmadik végzi majd a vizsgálandó minta adagolását. A chipen áthaladt folyadékokat egy közös gyűjtőedénybe vezetjük. A szakirodalom tanulmányozása során – lásd a 1.2. fejezetet – sok olyan alkalmazással találkoztunk melyben, a vizsgálandó alakos elemeket *lézerefény* segítségével világítják meg. Számukat a visszavert vagy áthaladó fény *intenzitásának mérésével* határozzák meg. Ezért döntöttünk úgy, hogy mi is lézerefényt fogunk alkalmazni a csatorna megvilágítására és az áthaladt fény intenzitását mérjük. A hardveres rendszertervben helyett kapott még egy *CCD kamera* is. Segítségével szeretnénk a csatornaszakaszt mikroszkóp alatt vizsgálni. Ez főleg a fejlesztési fázisban előnyös, de az előkép például szabályzási feladatra is felhasználható (lásd később). A szoftveres vezérlést LabVIEW segítségével kívánjuk megvalósítani. A program három párhuzamosan futó ciklus segítségével fogja elvégezni feladatát. Az *ütemező ciklus* a mérés elindítása után egy szkript fájlt olvas be soronként. Értelmezi azt és ennek megfelelően vezérli a mérőrendszer egyes eszközeit (mintaadagolás, szabályzás engedélyezése). A *szabályzási ciklusban* lesznek implementálva a szabályzókörok. Az ábrán látható szabályzókör a hidrodinamikai fókuszálás során előállított fókuszált folyadéksugár pozíciójának a szabályzását végzi. Olyan módon kívánjuk ezt megvalósítani, hogy egy kamera segítségével élő képet állítunk elő. A kapott képen képfeldolgozási feladatot végrehajtva – *optikai vizsgálat* – meghatározzuk a fókusz pozícióját. Ebből és a megadott referenciajelből hibajel képezhető, ami megfelelő bemenetet jelent egy szabályzó számára. A szabályzó a folyadékadagoló pumpa sebességén keresztül tud majd beavatkozni a rendszerbe, hogy módosítsa a fókusz pozícióját. Az imént említett feladatra azért lehet szükség, mert nem biztos, hogy a fókuszált csatornát átvilágító lézerefény és a fényintenzitást mérő detektor pontosan egy vonalba esik, és a kézi beállítással esetleg nem érhető el megfelelő pontosság,. A csatornát átvilágító lézerefény intenzitásváltozását az *adatgyűjtő ciklus* dolgozza fel. A *számláló* a mért intenzitásjel alapján eldönti, hogy vélhetően mikor haladt át vörösvértest a csatornán. Számukat eltárolja és a mérés végén egy *Log fájlba* menti. A beadagolt mintamennyiség és a számláló értékéből meghatározható a vörösvértest sűrűség, ami végső soron a diagnosztikai információt hordozza.

2.1. Mérőrendszer moduljai

Ahhoz, hogy egy Lab-on-a-Chip eszközt használni tudjunk, egy tesztkörnyezet kialakítására van szükség. A tesztkörnyezet biztosítja a vizsgált eszköz számára a megfelelő aktuátorokat és szenzorokat. Az általunk használt tesztkörnyezet az Elektronikus Eszközök Tanszékének gondozásában fejlődik. A továbbiakban a tanszéki tesztkörnyezet aktuátorait mutatjuk be².

¹Különbőlül 10 μm átmérőjű.

²A mérőasztal fotója az A.1 ábrán, a függelékben megtalálható.

2.1.1. Mérőasztal

Fecskendő pumpa

A fecskendő pumpák (A.1. ábra 2-vel jelölt eszköze) segítségével történik a folyadék áramoltatása a tesztkörnyezetben. Működését tekintve olyan, mintha egy orvosi fecskendővel áramoltatnánk folyadékot, de ez esetben a dugattyú mozgását léptetőmotoros hajtás segíti. A léptető motor fogas szíj segítségével egy orsót forgat meg, amin egy kocsi mozog előre vagy hátra, az orsó forgási irányának függvényében. A kocsi csatlakoztatva mozog a dugattyú, ezáltal megvalósítva a pumpálást, vagy a folyadék elszívását a rendszerből. A tanszéki tesztkörnyezetben szereplő pumpákat mikroléptetéses üzemmódban használjuk, így nagyon alacsony áramlási rátát³ érhetünk el a mikrofluidikai csatornában. A pumpa által elérhető áramlási ráta az alkalmazott fecskendő méretétől is függ, kis dugattyú keresztmetszettel rendelkező fecskendővel kisebb áramlási ráta érhető el.

2.1.2. Adatgyűjtő eszközök

National Instruments: compactRIO

A szenzorok által szolgáltatott jelek feldolgozására a termikus laboratóriumban található National Instruments⁴ CompactRIO⁵ (A.1. ábra 5-tel jelölt eszköze) mérőrendszer megoldását használtuk. A cég által kínált cRIO egy PC alapú rendszer amely moduláris felépítésű. A vezérlőegységen NI szabványnak megfelelő modulfogadó szlotok találhatóak, melyekbe az adott alkalmazásnak leginkább megfelelő mérőkártyákat csatlakoztathatunk. Egy ilyen módon összeszerelt rendszer látható a 2.2. ábrán. Az egyes kártyák létesítenek kapcsolatot a külvilággal, például digitális ki- vagy bemenetként szolgálnak. A modulokat a vezérlőegység irányítja, a fedélzeti processzorán megvalósított program alapján. Ennek megfelelően beállítja és vezérli az egyes modulokat, továbbítja a kártyák által fogadott információkat további feldolgozásra. Munkánk során a laboratórium NI



2.2. ábra. CompactRIO-9073-as vezérlőegység és a mérőkártyák

cRIO-9073-as controllerét használtuk, melybe az NI 9234-es analóg-digitális átalakító,

³Az áramlási ráta időegység alatt egységnyi felületen átáramló folyadékmennyiséget jelent. Mikroléptetéses üzemmódban ennek nagyságrendje néhány $\mu\text{l/s}$.

⁴A továbbiakban NI.

⁵A továbbiakban cRIO.

illetve az NI 9403-as digitális I/O modulokat helyeztük. Az NI cRIO-9073 egy Ethernet és RS-232 kommunikációval⁶ ellátott modulvezérlő egység. Nyolc különböző I/O modul fogadására képes. A cRIO-ban található nagy sebességű – ipari alkalmazásokban használt – processzor felelős a vezérlésért és az adatgyűjtésért.

Analóg-digitális átalakító. A bemenő analóg jelek analóg-digitális átalakításához egy NI 9234-es típusú mérőkártyát használtunk, melyet speciálisan nagy sebességű szenzorok mintavételezéséhez javasolnak. Az eszköz négy bemeneti csatornával rendelkezik a ± 5 V-os feszültségtartományban. A 24 bit-es Sigma-Delta AD átalakító maximális mintavételezési sebessége 51,2 kS/sec. Csatornánként tehát maximálisan 12,8 kHz mintavételezési frekvencia állítható be rajta.

Digitális ki- illetve bemenet. A külső digitális jelek fogadásához egy NI 9403-as mérőkártyát használtunk fel. A modul egy 32 csatornás, szabványos TTL feszültség-szinteken üzemelő, konfigurálható digitális ki- illetve bemenet.

National Instruments: 1772 Smart Camera

A vérsugarat, melyben az alakos elemek számlását végezzük, hidrodinamikai fókuszálással állítjuk elő. A hidrodinamika fókuszálást élő videókép alapján szabályozzuk. Az élő videóképet a National Instruments 1772 Smart Camera (A.1. ábra 8-cal jelölt eszköze) szolgáltatja, amely a tesztkörnyezetben lévő mikroszkópra van rögzítve egy speciális illesztőnyakon keresztül. Az általunk alkalmazott kamera egy speciális ipari kamera,



2.3. ábra. 1772 Smart Camera

mely programkód futtatására képes. A kamera a LabVIEW-ban megírt programkód alapján hajtja végre az élő képen a képfeldolgozási feladatot, így tehermentesítve a számítógép erőforrásait. Az általunk használt kamera 8-bites szürkeárnyaltos képet ad, viszont nagy képfrissítési sebességre – 110 Fps – képes.

Az általunk használt kamera a cRIO-hoz hasonlóan egy úgynevezett Real-Time eszköz, aminek segítségével nagy megbízhatóságú és pontos adatgyűjtés valósítható meg. A kamera a cRIO-hoz hasonlóan Ethernet-en keresztül kapcsolódik a PC-hez. A kamera 640 × 480 felbontásra képes, ellenben mérés során 320 × 240 felbontású képeket küldünk a felhasználói interfész felé, mivel kizárólag az áramlási profil kialakulása fontos számunkra, a részletesebb kép nem szolgáltat bővebb információt. A pontosabb szabályzási

⁶Ezek közül az Ethernet kommunikációt használtuk fel.

folyamat érdekében a kamerán futó élkeresési algoritmust a 640×480 felbontású képen hajtjuk végre.

2.1.3. Mikroszkóp

A tesztkörnyezetben a megfelelő optikai nagyítást mikroszkóp (A.1. ábra 6-tal jelölt eszköze) segítségével érjük el. A mikroszkóppal a chip-ben zajló áramlási jelenségeket vizsgáljuk optikailag. A mikroszkóp képét az NI Smart Camera segítségével digitalizáljuk, mely egy speciális nyakon keresztül kapcsolódik a mikroszkóphoz. A speciális nyakba egy optikai szálát vezetünk melyen keresztül a fókuszált vérsugarat világítjuk meg lézer segítségével.

A mikroszkóp képét kamerával rögzítettük 640×480 -as felbontásban. A kamera képét a chipen kialakított $100 \mu\text{m}$ szélességű csatornához igazítottuk. A kamera képén 130 pixel felel meg $100 \mu\text{m}$ -nek, tehát 13 pixel $10 \mu\text{m}$.

Lézer

Az alakos elemek számlása céljából a fókuszált vérsugarat lézerrel világítjuk át, és az intenzitásváltozásból következtetünk az egyes alakos elemek jelenlétére. A tesztkörnyezetben a folyadéksugár átvilágítására a ZYGO cég 7705-as számú lézerét (A.1. ábra 7-tel jelölt eszköze) alkalmazzuk. A 2.1. táblázatban a lézer legfontosabb jellemzőit foglaltuk össze.

Lézer típusa	Hélium-Neon gázlézer
Sugárzott energia	$250 \mu\text{W}$
Lézersugár átmérője	$4,1 \pm 0,3 \text{ mm}$
Névleges hullámhossz vákuumban	$632,992 \text{ nm}$
Hullámhossz stabilitás	$0,01 \text{ ppm/h}$

2.1. táblázat. ZYGO 7705 típusú lézer jellemzői

Érzékelők

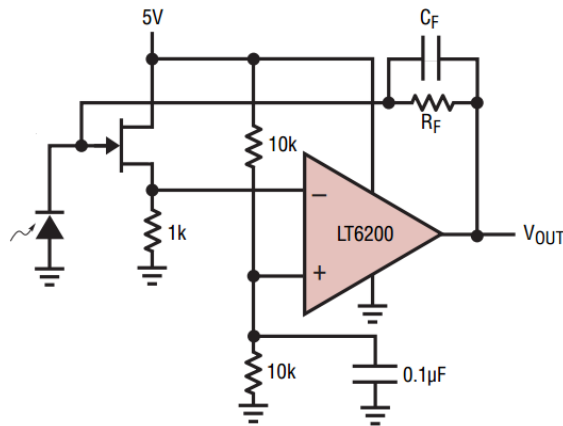
A folyadéksugár átvilágításához használt fénysugár intenzitásváltozásának érzékeléséhez a Hamamatsu cég S10784 jelzésű fotodiódáját (2.5(a) ábra) alkalmazzuk. Az érzékelőt a szükséges kiegészítő elektronikával a mikrofluidikai chip alá helyeztük el.

Az fotodióda legfontosabb tulajdonságait a 2.2. táblázat tartalmazza. A szenzor az

Effektív fényérzékelési terület	$7,0 \text{ mm}^2$
Spektrális válasz tartománya	$340 - 1040 \text{ nm}$
Érzékenységi csúcs	760 nm
Fotoérzékenység 660 nm-en	$0,45 \text{ A/W}$
Maximális zárófeszültség	20 V
Sötétáram $2,5 \text{ V}$ zárófeszültségen	1 nA

2.2. táblázat. Hamamatsu S10784 típusú szenzor jellemzői

alkalmazott lézeres megvilágítására alacsony jelszintet produkál, így kiegészítő elektronikaként a szenzorhoz kis zajú erősítőáramkört illesztettünk. A szenzorhoz kiegészítő áramkörként a Linear Technology LT6200-as erősítőt választottuk. Az alkalmazott kapcsolás a 2.4 ábrán látható. A kapcsolás kimeneti feszültségjelét (V_{OUT}) az NI 9234-



2.4. ábra. A fotodióda és a hozzá tartozó erősítőkapcsolás

es típusú mérőkártyával digitalizáljuk. Az érzékelőt a szükséges kiegészítő elektronikával a mikrofluidikai chip alá helyeztük el. A zavarvédelem miatt a kiegészítő elektronikát a szenzorhoz közel helyeztük el. A környezeti fényhatások elnyomása érdekében a szenzorhoz egy fedőlemezt készítettünk, melyen egy kis nyílást fúrva lecsökkentettük a környezetből beszűrődő fény mennyiségét, ezáltal pontosítva mérési eredményeinket.



(a) Hamamatsu S10784 fotodióda



(b) Osram BPX43 fototranzisztor

2.5. ábra. Alkalmazott érzékelők

Fototranzisztor. Méréseink során kiderült, hogy az általunk választott fotodióda a zajjal összemérhető jelet produkál, így nem megfelelő számunkra. A fotodiódát egy Osram BPX43 típusú fototranzisztorral (2.5(b) ábra) helyettesítettük. Erősítésre a fotodiódához felhasznált erősítő áramkört alkalmaztuk. A választott fototranzisztor fő tulajdonságait a 2.3. táblázat foglalja össze.

Optikai rendszer méretezése

A mérések kivitelezéséhez az optikai elemek megfelelő elhelyezése szükséges. A mikroszkóphoz lézeres és állítható teljesítményű izzós megvilágító egység tartozik. Méréseink

Effektív fényérzékelési terület	7 mm ²
Spektrális válasz tartománya	450 – 1100 nm
Érzékenységi csúcs	880 nm
Relatív spektrális érzékenység	42%
Legnagyobb érzékelhető frekvencia	27 kHz

2.3. táblázat. Osram BPX43 típusu fototranzisztor fontosabb tulajdonságai

során a szenzor megfelelő elhelyezése kulcsfontosságú. A lézersugár 62,5/125-ös optikai kábelen keresztül jut a mikroszkóphoz. Ezt azt jelenti, hogy a kábeltől kilépő sugár átmérője 62,5 μm . Ezt a sugarat csatoljuk a mikroszkópba. A becsatolás helye 15 cm-en mozgatható. Segítségével állítható, hogy a fókuszált lézerfolt melyik síkban legyen a mikrofluidikai chipen. Az illesztőnyakon két lencsével fókuszáljuk a lézersugarat. Az illesztőnyagról érkező sugár egy tükrön keresztül a mikroszkóp objektívjére juttatja a lézerfényt, ahol ismét fókuszálódik. A lézersugár a mikroszkópon áthaladva 10 μm átmérőjűre fókuszálódik. Ezzel a sugárral világítjuk meg a csatornát. A rendszer sematikus ábrája az A. függelékben található az A.3. ábrán. A csatornából kilépve a fény kúp alakban terjed a szóródások következtében. A kialakult kúp miatt számításokat végeztünk arra, hogy a detektort milyen távol kell elhelyezni a csatornától ahhoz, hogy a szenzor érzékelési területére megfelelő mennyiségű fény jusson. Ez a számítások alapján 1,48 cm, mely számítás részletei a *Fotodióda elhelyezése* tárgyú jegyzőkönyvben megtalálhatók.

Az alkalmazott szenzorok optikai szenzorok, melyeknél fontos paraméter az érzékelhető jel frekvenciája. Ennek kiszámolásához a következő modellt alkalmazzuk. Először meghatároztuk a dugattyú előtolási sebességét. Ezt úgy határoztuk meg, hogy egy 5 ml-es fecskendőrt rögzítettünk a Graseby reagens adagoló pumpában, és mértük azt, hogy adott idő alatt mennyit halad előre a dugattyú, ez 0,025 mm/sec-ra adódott 30 ml/h áramlási ráta esetén. Méréseink során 0,3 ml/h rátát állítottunk be, így a fenti értéket átszámítottuk az új áramlási rátának megfelelően, ez 0,00025 mm/sec. Azt feltételezzük, hogy az áramlási sebesség a felületekkel fordítottan arányos. A dugattyú felülete 125 mm², a csatorna felülete 0,1 mm·0,1 mm, ami 0,01 mm². A felületek aránya 1:12500 ami alapján a csatornában az áramlási sebesség 12500·0,00025 mm/sec, ami 3,125 mm/sec. Ebből a sebességből kiszámítjuk azt, hogy 100 μm -es szakaszt mennyi idő alatt tesz meg a folyadék. Ez az érték az áthaladási idő, ami 0,0312 sec. A csatorna fókuszálás előtti szakaszában egy 100 μm ×100 μm ×100 μm -es térfogatban 50 sejtet feltételezünk. A frekvenciát úgy számítjuk, hogy ezt az 50 sejtet leosztjuk az áthaladási idővel, ami 1,6 kHz. Fontos megemlíteni, hogy ez a modell pár elhanyagolást és közelítést tartalmaz, melyek vizsgálata további méréseket, modellezést igényel. A számításaink alapján az alkalmazott érzékelők bőven meghaladják a meghatározott értéket.

2.1.4. Hardvervezérlő egység

A tesztkörnyezet hardvervezérlő egysége (A.1. ábra 4-gyel jelölt eszköze) teremti meg a kapcsolatot a számítógép valamint a mérőasztal egységei között. A hardvervezérlő moduláris felépítésű. Az egyes aktuátorokat vezérlő elektronikák külön nyomtatott áramkörtárcsákra foglalnak helyet. Az egyes vezérlőkártyákon található egy-egy mikro-

kontroller, amely a buszon keresztül érkező adatforgalom lebonyolításáért és a kártyán található elektronika vezérléséért felelős. A kártyák egy Eurocard rack-be csatlakoztathatóak, szabványos Eurocard DIN 41612-es csatlakozó segítségével. A moduláris felépítés magával hordozza a későbbi bővítés lehetőségét. Az egység a PC-vel soros porton kommunikál. A hardvervezérlő egységbe az alábbi kártyákat illesztettük:

- Fővezérlő (*Master*) modul
Az egyes modulok a *rendszerbuszon* keresztül kapcsolódnak egymáshoz. A *rendszerbusz* vezérlését a *Master* főmodul végzi el, ami a többi (*Slave*) modul vezérléséért felelős. A *Master* fővezérlő modul számítógép felől érkező utasítás hatására a buszra új információkat küld: a vezérelendő aktuátor címét, valamint három byte vezérlési információt.
- Motorvezérlő modul
A folyadékáramlást biztosító fecskendő pumpák léptetőmotorjait vezérli a rendszerbuszon érkező vezérlési adatok alapján.

2.1.5. Mikrofluidikai chip

A hidrodinamikai fókuszálás megvalósítására speciális mikrofluidikai chip-re van szükség. A fókuszáláshoz olyan két dimenziós fókuszáló rendszert használunk, melyben két egymással szemben laminárisan áramló folyadék préseli a véráramot az eredeti csatornaszélesség töredékére. A mikrofluidikai fókuszáló chip (A.1. ábra 1-gyel jelölt eszköze) Hantos Gusztáv doktorandusz munkája [18].

Csatornarendszer tervezése

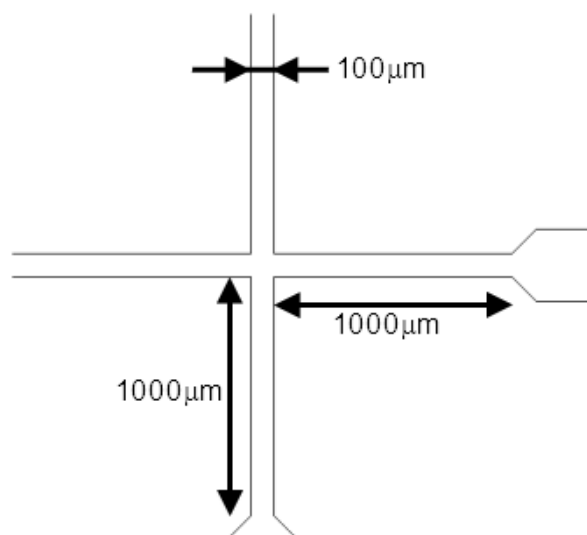
A hidrodinamikai fókuszálást megvalósító csatornarendszer megtervezésének első lépése, az ismertett áramlástan ismeretek alapján, a csatornák geometriájának kialakítása volt. A választott geometria, a vonatkozó szakirodalomban is ismertett leggyakoribb, 90°-os keresztirányú csatornaelrendezés. Ez abban az esetben előnyös, ha vékony fókuszált sugarat szeretnénk kapni, mivel ilyenkor merőlegesen találkozik a reagens és a fókuszáló anyag csatornairányú áramlás komponense. A célkitűzés szerint a fókuszált vérsugár szélessége 10 μm , amiben az alakos elemek sorba rendeződve haladnak át egyesével. A csatorna 100 μm szélességűre lett megtervezve, mivel a célkitűzés 10%-os fókuszálás elérése volt. A csatorna hosszának meghatározása a rendelkezésre álló irodalom alapján történt. Az elvárt áramlási profil kialakulásához szükséges hossz

$$x_{\text{profil}} = \frac{\text{Re}}{20}d = 100 \mu\text{m}. \quad (2.1)$$

Ahol Re a *Reynolds-szám*⁷, d pedig a csatorna szélességét jelöli. A kiszámolt csatornahossz alapján a csatornahossz 450 μm -re lett megválasztva a csatorna szimulációjához, így még nagyobb áramlási ráták esetén is (ami nagyobb *Reynolds-számot* eredményez) bizonyosan kialakul az elvárt áramlási profil.

A szimulációs eredmények alapján a kialakított struktúra megfelelőnek bizonyult, így a tervezett eszköz gyártásra került. A gyártás során a fókuszálási szakasz 450 μm -ről 1000 μm -re lett növelve. A tervezett chip CAD rajzának részlete a 2.6 ábrán látható.

⁷A képlet alkalmazása során a Reynolds-szám értéke 20 volt.

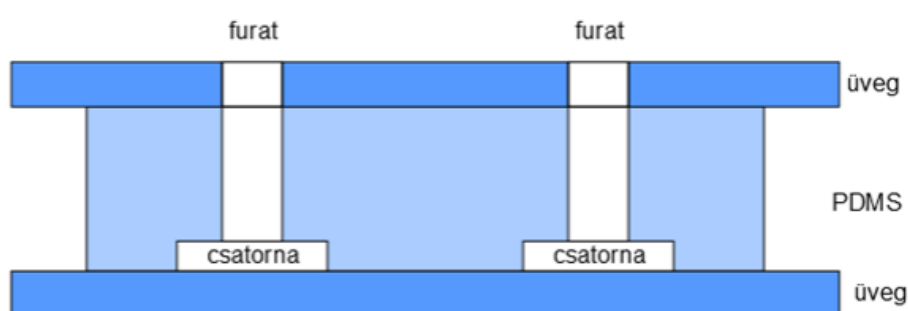


2.6. ábra. A csatorna CAD rajzának részlete

A mikrofluidikai chip megvalósítása

A mérésekhez használt chip alapja a PDMS⁸ technológia, mely költséghatékonyt megoldást kínál. A PDMS egy szobahőmérsékleten rugalmas, gumi-szerű anyag, ezért megmunkálás egyszerű. A PDMS optikai tulajdonságai kedvezőek a méréseink szempontjából, hiszen a PDMS áttetsző anyag, így az áramlás mikroszkóp alatt megfigyelhető.

A csatornarendszer PDMS technológiával lett kialakítva. Mivel az anyag rugalmas, a csatlakozók rögzítése problémát okoz, így a PDMS technológiával kialakított csatornarendszer üveglemezen lett megvalósítva, melynek mérete 75×25 mm. A csatorna megfelelő mechanikai védelme érdekében a csatorna másik oldala is üveglemezzel lett lefedve⁹. A kialakított szendvics szerkezet a 2.7. ábrán látható¹⁰. A kialakításnak kö-



2.7. ábra. A szendvics szerkezetű chip vázlata

szönhetően a chip közvetlenül befogatható a tárgyasztalon található befogószerkezetbe.

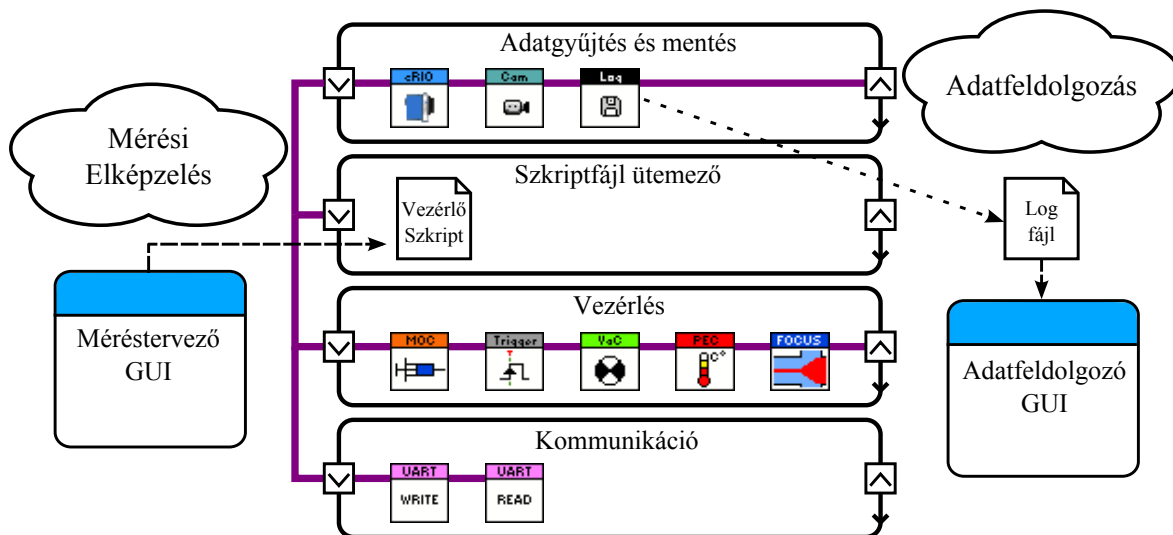
⁸Poli-dimetil-sziloxán

⁹A méréseink során felmerült reflexió alapú számlálás is. A reflexióhoz olyan szendvics szerkezetet használtunk, melynek egyik fedőlemeze az üveg helyett szilícium lemez.

¹⁰Ezúton szeretnénk köszönetet mondani az MTA-MFA munkatársainak a chip legyártásáért.

2.2. Mérésvezérlő szoftver tervezése

A mérésvezérlő szoftver rendszerterve a 2.8. ábrán látható. Mint már korábban említettük a szoftvert LabVIEW platformon kívánjuk megvalósítani, ezért néhány platform specifikus fogalmat is használunk majd a bemutatás során. Az előzetes terveknek megfelelően a tesztkörnyezet vezérlését párhuzamosan futó ciklusok végzik. A *méréstervező GUI* egy külön program, melyben az általunk elképzelt mérést valósíthatjuk meg. Ehhez meg kell adnunk, hogy a mérőrendszerben lévő egyes eszközöket, milyen időfüggvénynek megfelelően és milyen beállításokkal szeretnénk vezérelni. Ha megfelelőnek tartjuk az általunk beállított értékeket a GUI egy *szkriptfájl* generál az adatokból. A fájlt a *szkriptfájl ütemező* ciklus értelmezi és hajtja végre soronként. A végrehajtást úgy kell érteni, hogy az értelmezett utasításoknak megfelelően a mérőrendszerben található eszközök számára vezérlőparancsot generál. A vezérlőparancs egy közös sorba kerül befűzésre. Előfordulhat az az eset, hogy egy eszköz számára valamekkora alapjel



2.8. ábra. Mérésvezérlő szoftver rendszerterve

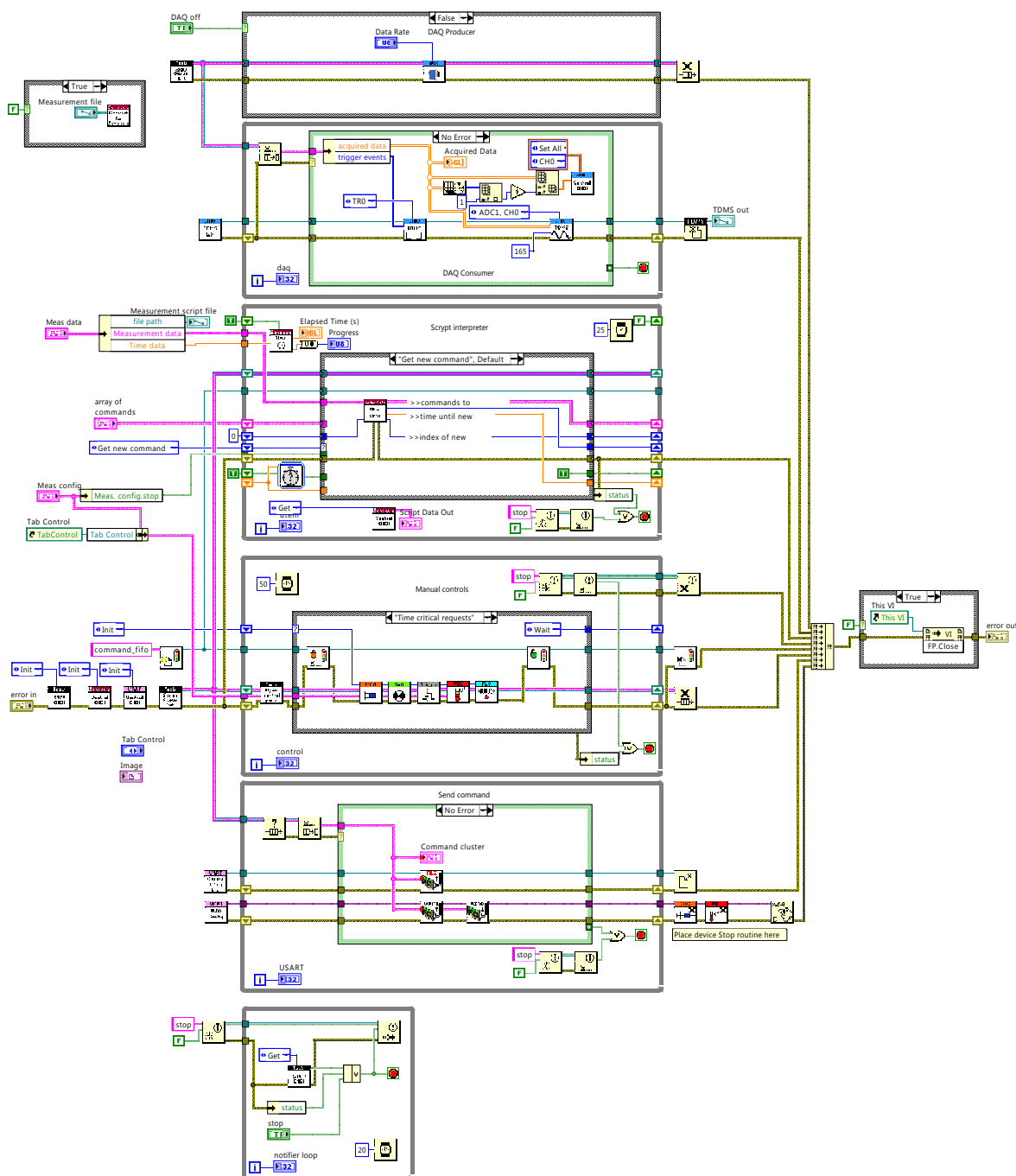
értéket kívánunk előírni. Ilyen utasításokat szintén tud értelmezni az ütemező. Amikor a szükséges vezérlőparancsot nem ő generálja, hanem a beállítandó alapjel értéket átadja a *vezérlés* ciklusban található úgynevezett eszközvezérlő VI-oknak. Az eszközvezérlő VI egy egységes bemenetekkel és kimenetekkel rendelkező VI. A mérőrendszerben található összes modul számára külön-külön kell specifikusan implementálni és beilleszteni. A VI rendelkezik egy virtuális előlappal, melyen az adott eszközre jellemző és állítható paraméterek találhatóak. A felhasználó ennek segítségével tudja manuálisan vezérelni a mérőrendszer eszközeit. Bizonyos eszközöknél a VI valamilyen szabályzást is megvalósít, szintén ezen az előlapon van lehetőség a szabályzás ki-be kapcsolására. Ha a szkriptfájlban egy adott eszköz számára valamekkora alapjel érték van előírva, akkor az ütemező az adott eszközhöz tartozó VI-nak adja át az alapjel értékét. A VI a szükséges alapjelugráshoz tartozó vezérlőparancsokat létrehozza és ugyan abba a sorba fűzi melybe az ütemező ciklus is. A *MOC* feliratú ikon jelképezi a fecskendő pumpák vezérlésére szolgáló felületet. A felhasználó itt áramlási rátákat tud beállítani. Lehetőség lesz az egyes fecskendő pumpák szabályzott vezérlésére is. A *Trigger* feliratú ikon a mérőrendszerben található TTL szintű kimenetet vezérli. A *VaC* feliratú ikon a

rendszerben található két szelep vezérléséért felelős. A *FOCUS* feliratú ikon a fókuszált folyadéksugár szabályzását végzi a kamerakép alapján. Segítségével az utolsó pár mikront szoftveresen tudjuk korrigálni. A *kommunikáció* feliratú ciklus felelős azért, hogy a mérőrendszer felé egy soros kommunikációs vonalon kiküldje azokat a vezérlőparancsokat, melyeket az ütemező- és vezérlés ciklus generáltak. A vezérlőparancsok felépítése egységes, négy bájt információt tartalmaz. Az első bájt azonosítja a slave modult amelynek a vezérlőparancs szól (ID). A második bájt tartalmazza a vezérlőparancs kódját (BC). A harmadik és a negyedik bájt a vezérlőparancshoz tartozó esetleges további adatokat tartalmazza (B1 és B2). Az imént ismertetett parancsformátum UART-on történő kiküldéséért az *UART write* feliratú folyamat felelős. Szintén a kommunikációs ciklus feladata, hogy a mérőrendszer felől a soros vonalon érkező adatokat fogadja és eltárolja, ezt az *UART read* valósítja meg. Adatok nem csak a soros vonal felől érkehetnek, hanem a 2.1.2. fejezetben ismertetett eszközöktől is. Az ezek felől érkező adatok fogadását és mentését az *adatgyűjtés és mentés* ciklus valósítja meg. A *cRIO* feliratú ikon végzi a mérőrendszerhez csatlakoztatott cRIO felől érkező adatok fogadását és mentését. A méréseink során csak egy ADC és egy DIO modul csatlakoztatunk majd a vezérlőegységbe. E két modul felől érkező adatokat a *Log* feliratú ikon menti majd el egy mérési fájlba. A keletkezett mérési fájl egy külön erre a célra készített programmal lehet majd megnyitni, ez az *adatfeldolgozó GUI*. Itt lehetőségünk van a mintavételezett adatokat a DIO felől érkező trigger eseményeknek megfelelően feldolgozni és megjeleníteni. A *Cam* felelős azért, hogy a mikroszkóphoz csatlakoztatott kamera által rögzített élőképet és a kiszámolt fókuszpozíciót fogadja. Mint már korábban említettük, a kamerán képfeldolgozási feladat is futni fog.

2.2.1. Forráskód

A fent említett feladatokat ellátó LabVIEW forráskód a 2.9. ábrán látható. A program öt párhuzamosan futó ciklusból áll. A *DAQ Producer* és *DAQ Consumer* ciklusok a beépített *Producer/Consumer* tervezési minta felhasználásával készültek. A két ciklus között egy sor¹¹ segítségével történik az adatcsere. A *DAQ Consumer* ciklust a *DAQ Producer* időzíti. Ha új adat kerül befűzésre a sorba, akkor a *DAQ Consumer* azonnal lefut és feldolgozza a kapott információt. Jelen esetben a sor egy mátrixot – *acquired data* – és egy vektort – *trigger events* – tartalmaz. Az *acquired data* nevű mátrixban találhatóak az ADC modul által mintavételezett adatok. A nulla indexű sorban a nulla indexű csatorna – *CH0* – adatai találhatóak, az egy indexűben az egy indexű csatorna – *CH1* – és így tovább. Az *NI 9234-es ADC modul összesen négy bemeneti csatornát tartalmaz.* A *trigger events* vektor tartalmazza a DIO modul felől érkező felfutó él időpontjait. Egy felfutó élhez két adat tartozik. Az mintavételezett adatok továbbítása a számítógép felé egy időablaknak felel meg. Az időablakon belül egy számláló fut, mely maximális értéke a mintavételezés sebességétől függ. Az egyes időablakokon belül ez a számláló mindig elszámol nullától a maximális értékéig. Ha bekövetkezik egy trigger esemény, akkor mentésre kerül az aktuális időablak sorszáma és a ez a bizonyos számlálóérték. A *DAQ Consumer* ciklus megjeleníti az analóg adatokat. Valamint elmenti ezeket és a trigger események időpontjait egy TDMS mérési fájlba. A ciklus továbbá frissíti a *cRIO* címkéjű *Control 0101* feliratú változót. Jelen alkalmazásban értékét arra használjuk, hogy a fecskendő pumpa motorjának szabályzását megvalósítsuk az úgynevezett pumpavezérlő eszköz VI-ban.

¹¹LabVIEW terminológiával queue.



2.9. ábra. Mérésvezérlő szoftver forráskódja

Parancsküldés a mérőrendszer felé két módon lehetséges. Az elsőnél maga a felhasználó küldhet ki vezérlőparancsokat az egyes eszközökhöz tartozó eszközvezérlő VI-on keresztül. A második lehetőségénél egy szkriptfájlt készít el, melyben adott időzítéssel vezérli az egyes eszközöket. Ezt a fájlt egy szkriptértelmező feldolgozza és generálja a szükséges parancsokat. A fent említett feladatokat két-két, szintén párhuzamosan futó ciklus látja el. A szkriptfájl feldolgozását a *Script interpreter* ciklus végzi, ezt a funkciót azonban méréseink során nem használtuk. Az eszközvezérlő VI-okat a *Manual controls* nevű ciklus vezérli. A ciklus egy állapotgép struktúrát valósít meg. Állapotai

és funkciójuk a következő:

- Init
- Time critical requests
- Wait
- Read results
- Action
- Deactivate loop

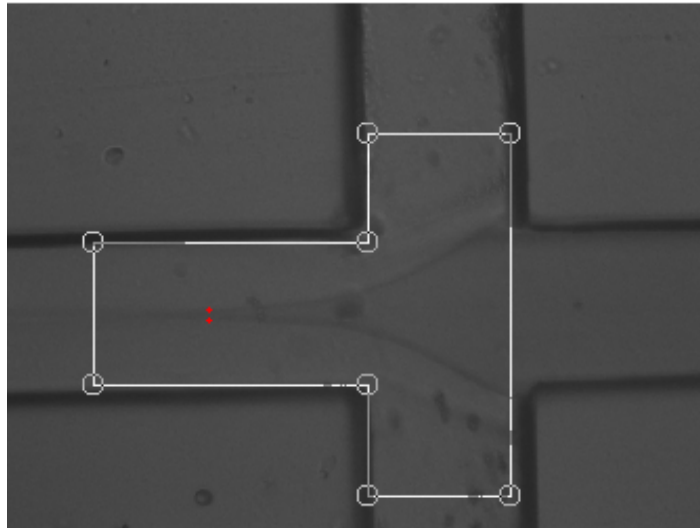
Az *Init* és a *Deactivate loop* állapotok csupán egyszer futnak le. A program elindításakor az *Init*, leállításakor a *Deactivate loop*. Ezekben az állapotok inicializációs és az egyes hardver eszközök biztonságos nyugalmi állapotba helyezéséért történő feladatok végrehajtásáért felelősek. Normál működés során négy állapot váltja egymást, ezek sorban *Time critical requests*, *Wait*, *Read results* és *Action*. Ebben az állapotban zajlik a vezérlőparancsok generálása és befűzése abba a sorba, mely a mérőrendszer hardver-vezérlője felé fog kiküldésre kerülni. Felhasználó által látott előlapi elemek frissítése vezérlőparancsoknak és a fogadott adatoknak megfelelően. A mérőrendszer felől érkező adatok kiolvasása, értelmezése és eltárolása. A mérőrendszer felől érkezett adatok alapján szabályzási feladatok megvalósítása, szükséges beavatkozási jel kiszámolása, illetve a kiszámolt beavatkozási jel elmentése. Mérőrendszerben található eszközök biztonságos leállítása. A mérésvezérlő program leállításakor fut csak le ez az állapot.

2.2.2. Kameronsoftver

Mint már korábban említettük a képfeldolgozási feladat a kamera fedélzeti processzoron fut. Mivel a cRIO-n futó szoftverrel ellentétben itt nem volt lehetőségünk aszinkron módon indítani az eszközön futó programot, azt a megoldást választottuk, hogy egy változó segítségével futtatható a tényleges képfeldolgozást végző kód. A fókuszált sugár pozíciójának szoftveres meghatározására élkeresést végzünk, egy ilyen feladat egyetlen képkockája látható 2.10. ábrán. A szoftver úgy lett implementálva, hogy 100 FPS-es sebességgel működjön, tehát 10 ms-onként történik a 640×480 felbontású, 8-bites szürkeárnyalatos képek beolvasása. Minden indításkor automatikusan generálódik egy „T” alakú, előre meghatározott pozíciójú és méretű ROI¹². Ez szabadon pozicionálható, célja, hogy a lehető legpontosabban a tényleges csatornára helyezze a felhasználó. Az élkeresés koordinátái ehhez képest kerülnek kiszámításra. A talált élek koordinátái megjelenítésre kerülnek az élképen, továbbá ezekből az adatokból kiszámításra kerül, hogy milyen széles a fókuszált sugár és hol található a közepe. Ezek az információk mikrométerben kerülnek megjelenítésre, öt mintás mozgóablakos átlagolás után. A később ismertető szabályzási feladathoz természetesen átlagolás nélküli értékeket használunk.

A szoftver élesztése során azt tapasztaltuk, hogy az élkeresés pontossága függ a mikroszkópon beállított fókuszról, a megvilágítás intenzitásától és a fókuszált folyadék színétől. Ezért úgy döntöttünk, hogy a felhasználónak lehetősége van az élkeresési beállítások finomhangolására. Az általunk javasolt kiindulóértékeket a 2.4. táblázatban

¹²Region Of Interest, az általa definiált tartományon belül zajlanak a képfeldolgozási feladatok.



2.10. ábra. Élkeresés a kamera segítségével

foglaltuk össze. Az *Edge Polarity*, *Interpolation Type* és a *Data Processing Method* beállításokat minden esetben az alapbeállításon hagytuk. A *Kernel Size* segítségével érzékenyíthetjük az élkeresést. Minél nagyobb ez az érték, annál inkább élnak érzékeljük az azonos intenzitású pixeleket. A *Width* specifikálja azt a pixelszámot, hogy a keresési irányra merőlegesen legfeljebb milyen hosszúságú tartományon keressünk. A *Minimum Edge Strength* határozza meg, hogy minimum milyen szélességű éleket érzékelhetünk.

Edge Polarity	All Edges
Kernel Size	9
Width	5
Minimum Edge Strength	3,00
Interpolation Type	Zero Order
Data Processing Method	Avarage

2.4. táblázat. Élkeresés kiinduló értékei

Szabályzó implementálása képfeldolgozás alapján

A hidrodinamikai fókuszálást élő videókép alapján szabályozzuk. A fókuszált sugarat a középvonaltól esetenként el kell téríteni, hogy a lézersugár teljes egészében a csatornát világítsa át. Az utolsó néhány μm eltérést a középvonal és a lézersugár helye között a szabályzóval korrigáljuk.

A képfeldolgozó algoritmus a csatorna képén élkeresést végez. Az élkeresési-algoritmus detektálja a fókuszált folyadéksugár két szélét, melyből meghatározható a folyadéksugár középvonalának helye és a fókuszált sugár szélessége. A szabályzás beiktatásakor megadható paraméter a folyadéksugár középvonalának elvárt helye, míg a PID szabályzó másik bemenő paramétere a kamera által mért pozíció. A kamera által számított pixel értéket a kamerával automatikusan átszámítjuk μm egységekre. A kamera által meghatározott pozícióból mozgó átlagot képzünk, így a mérési zajt csökkentjük.

A PID szabályzó – melynek blokkvázlata a 2.1. ábrán látható – az *A* jelű fecskendő pumpa áramlási rátáját módosítja, amennyiben ez indokolt. Az élkeresési algoritmus kiindulási paramétereit a 2.4. táblázatban ismertettük.

2.2.3. Mintavételi, adatgyűjtő algoritmus

A mérőrendszerben található analóg szenzorok jelének a mintavételezése a cRIO-ba csatlakoztatott NI-9234-es AD átalakító modullal történik. A modul négy szenzor jelét képes egyszerre mintavételezni. Legfeljebb 51,2 kS/sec mintavételi sebességre képes, ez csatornánként 12,8 kS/sec-os sebességet jelent. A mérőrendszer felől digitális jelek is rendelkezésre állnak, melyek különböző aktuátor eszközök engedélyező jelei. Ezek mint trigger jel kerülnek felhasználásra és az NI-9403-as – konfigurálható digitális I/O – mérőkártyára lesznek kötve. A kártya összesen 32 porttal rendelkezik, az igaz vagy hamis érték megállapítása a TTL feszültség szintek alapján történik.

A modulokból érkező adatok kiolvasását és a számítógép felé történő továbbítását a cRIO fedélzeti processzorán futó FPGA program végzi. A program az egyes mintavételi ciklusokban összegyűjti az AD átalakító és a digitális I/O modul felől érkező adatokat. Az analóg bemeneten érkező adatok veszteségmentes továbbítása a célunk Ethernet vonalon keresztül a számítógép felé. Annak érdekében, hogy ne terheljük túl a hálózatot, a mintavételezett adatokat egy adott méretű FIFO-ba gyűjtjük. A FIFO mérete úgy van beállítva, hogy – az adott mintavételezési sebesség függvényében – 400 ms-onként beteljen¹³. Ennek hatására egy interrupt generálódik, és a számítógép egyszerre kiolvassa a benne tárolt információt. A számítógép az egyes csatornához tartozó adatokat egy úgynevezett TDMS¹⁴ mérési fájlba menti utófeldolgozás céljából.

Általában nem az összes begyűjtött adatra van szükség, hanem csupán bizonyos események közötti információ érdekel minket. Az eseményeket a bekövetkezését a trigger vonalon keresztül érzékeli az FPGA szoftver. Ha a trigger vonalon bérkezik egy felfutó él, akkor rögzítésre kerül bekövetkezésének időpontja. Az időpontokat szintén egy FIFO-n keresztül továbbítjuk a számítógépnek, mely a már említett mérési fájlba kerül eltárolásra. Az események időpontja a következő módon értelmezett. A mintavételezett adatok 400 ms-onként történő továbbítása a számítógép felé egy időablaknak felel meg. Az időablakon belül egy 0-tól a 100 ms-nak megfelelő mintaszámig egy számláló fut. A számláló ezen értéke a mintavételezési sebességtől függ. Ha bekövetkezik a trigger esemény, akkor elmentésre kerül az aktuális időablak száma és az időablakon belül futó számláló értéke.

Adatfeldolgozó GUI

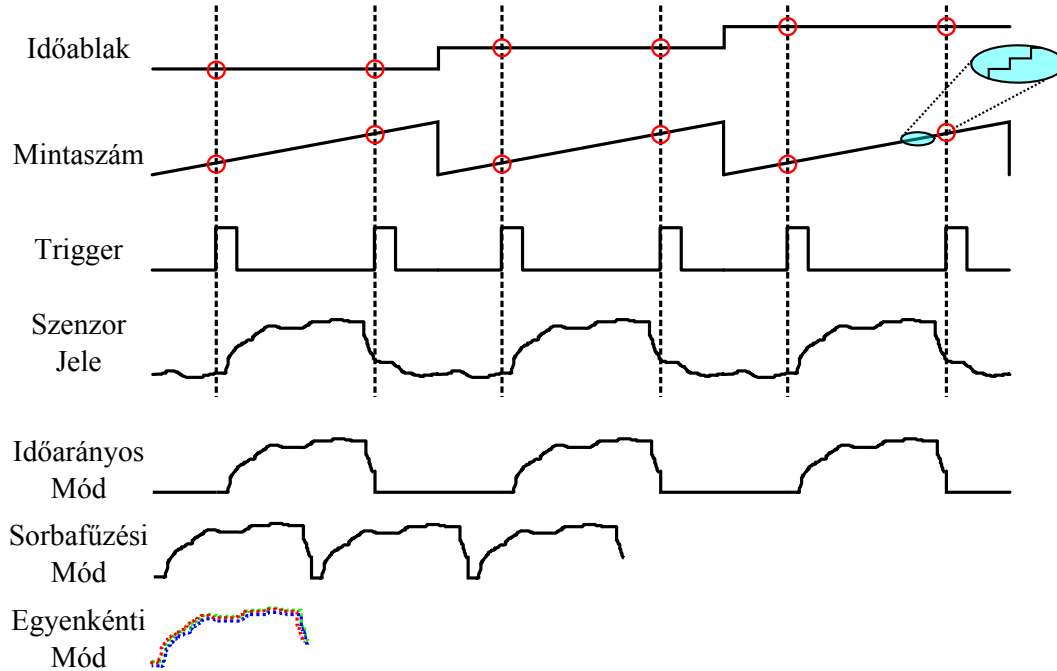
Annak érdekében, hogy a több száz mért érték közül lehetőség legyen egyszerűen kiválasztani a számunkra fontos adatokat, létrehoztunk egy adatfeldolgozó programot. A program beolvassa a TDMS mérési fájlban található információkat. A trigger események időpontjai alapján kiválasztja és megjeleníti kívánt események között mintavételezett adatokat.

A megjelenítés módja háromféleképpen történhet, melyeket a 2.11. ábrán szemléltetünk. *Időarányos mód* esetén csupán a két trigger esemény közti adatok kerülnek

¹³Minden csatornához 100 ms-nyi információ tartozik.

¹⁴A National Instruments által kifejlesztett fájlformátum, mely ideális több forrásból érkező adatok átlátható tárolására.

megjelenítésre. A többi helyen az eredetileg mintavételezett adatok nulla értékkel felülírásra kerülnek. *Sorbafűzési mód* esetén szintén két trigger esemény közti adatok kerülnek megjelenítésre. A két trigger eseményen kívüli adatok törlésre kerülnek. *Egyenkénti mód* esetén a két trigger esemény közti adatok azonos időskálán kerülnek megjelenítésre. Az egyes trigger események kezdőpontjai azonos origóba kerülnek.



2.11. ábra. Megjelenítési módok szemléltetése

3. fejezet

Mérések és eredmények

3.1. Felhasznált eszközök és anyagok

3.1.1. Mérési elrendezés

A méréseket a tanszéki mérőrendszeren végeztük el. A tanszéki mérőrendszer aktuátorait felhasználva hajtottuk meg a korábban bemutatott – lásd a 2.1.5. fejezetet – mikrofluidikai chipet. A mérőasztal részét képező két OEM fecskendőpumpával áramoltattuk a buffer folyadékokat a csatornában. A vér áramoltatását egy Graseby 3100 típusú orvosi alkalmazásokban használt fecskendő pumpával végeztük el. A pontos beállításokra a 3.2.1. fejezetben részletesen kitérünk.

A hidrodinamikai fókuszálásra alkalmas chip-et a mérőasztal tárgyasztalán helyeztük el. A fényintenzitást érzékelő szenzor, a kiegészítő áramkörrel együtt, a chip alá lett elhelyezve. A tárgyasztalt melyre a mikrofluidikai chip van befogatva, a mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük optikai megfigyelés céljából. A mikroszkópon a megfelelő nagyítást a mikroszkóphoz csatlakoztatott kamera képe alapján állapítottuk meg. A kép beállítása után, a mikroszkóp nyakához csatlakozó optikai kábelon keresztül bevezettük a fókuszált sugár átvilágításához szükséges lézersugarat. A vérsugár átvilágításához a ZYGO cég 7705 típusú lézert használtuk fel, mely 632 nm hullámhosszú fényt bocsát ki, 250 μW sugárzási teljesítménnyel. A alakos elemek jelenlétére az lézerfény intenzitásváltozásából következtetünk. A fény intenzitásváltozását egy Hamamatsu gyártmányú S10784 típusú fotodiódával érzékeljük. A szenzor erősített jelét egy NI 9234 analóg-digitális átalakítóval dolgozzuk fel, mely egy NI cRIO-hoz van csatlakoztatva. A mérési elrendezés fényképe az A.1 ábrán, a függelékben található.

3.1.2. Alkalmazott folyadékok

A mérések során három különböző folyadékot használtunk fel:

- Vér

A mérések során birkavért használtunk. Mivel a birkavér hasonló összetételű mint az emberi vér, következtethetünk arra, hogy az általunk alkalmazott sejtszámlálási módszer a későbbiekben emberi vér esetében is alkalmazható lesz.

- Hayem-oldat

A Hayem-oldat (0,5% NaCl, 2,5% Na₂SO₄, 0,025% HgCl₂) hipertóniás oldat, mely a hígítás során a vörösvérsejteket zsugorítja, optikai sűrűségüket fokozza. A megfelelő arányú vér-Hayem-oldat keverék előállítását a 3.2.2 részben részletezzük.

A Hayem-oldat legfontosabb jellemzője, hogy kizárólag a vörösvértestekkel lép reakcióba, a vér többi összetevőjét nem módosítja.

- Desztillált víz

A vérsugár fókuszálására alkalmazzuk, mint buffer folyadék. A desztillált vizet előnyös optikai tulajdonságai miatt alkalmazzuk, a kamera képén jól elkülöníthetővé teszi a koncentrált folyadéksugarat.

3.2. Mérési eredmények

3.2.1. Optimális áramlási ráták meghatározása

A mérések elvégzéséhez első lépésként meg kell határozni az optimális áramlási rátákat. Az optimális áramlási ráta beállítások esetén a fókuszált sugár a csatorna középvonalára összpontosul, és szélességében az ingadozás minimális. Az optimális paramétereket kísérleti alapon határoztuk meg. A mérések kiindulási alapja a tanszéken korábban megvalósított hidrodinamikai fókuszálás eredménye volt. A kísérletek során a 3.2 táblázatban összefoglalt beállításokat vizsgáltuk a fent meghatározott feltételek alapján.

Buffer <i>A</i> és <i>B</i>	Reagens	Megfigyelések
60 $\mu\text{l/s}$	13,8 $\mu\text{l/s}$	Hosszú profilú fókuszálás
32 $\mu\text{l/s}$	7 $\mu\text{l/s}$	Rövid profilú, élesen elkülönülő csatorna
15 $\mu\text{l/s}$	3,5 $\mu\text{l/s}$	Rövid profilú, élelten csatorna
5 $\mu\text{l/s}$	5 $\mu\text{l/s}$	Lassan kialakuló, rövid profilú, élelten csatorna

3.1. táblázat. Áramlási rátákkal végzett mérések beállításai és megfigyelései

Az elvégzett mérések során egyetlen beállítás esetén sem sikerült szabad szemmel elkülöníteni a sejteket. A sejtek sebessége a fókuszált csatornában a közelítő számítások alapján 3,128 mm/s. A mikroszkópon megfigyelhető csatorna hossza 250 μm , így egyenes vonalú egyenletes mozgást feltételezve a sejtek közel 40 μs alatt áramlanak át, így egyértelműen érzékelhetetlenek szabad szemmel. A fókuszált csatorna során azért döntöttünk a kiindulási alapként szolgáló áramlási ráták csökkentése mellett, hogy a sejtek a fókuszálás során a torlódás következtében lehetőleg ne egy folytonos szakaszt alakítsanak ki, hanem egymáshoz képest valamekkora Δd távolságuk legyen. Ez a szakasz a hígítási arány növelésével is kiküszöbölhető. A gyors sejtek áthaladása nagy frekvenciájú jelváltozást okoz a fotodiódán, a hozzávetőlegesen 1,6 kHz-es frekvencia a szenzor érzékelési tartományán belül van (még akkor is ha a közelítésekkel egy nagyságrendet tévedünk), így amennyiben a sejtek közt valamekkora távolság van, a szenzor segítségével bizonyosan elkülöníthetjük azokat. A fenti megfontolások alapján a 3.2 táblázat szerint választottuk meg az áramlási rátákat. Az áramlási ráták meghatározása során 1:100 arányú vér-hayem-oldat keveréket használtunk fel.

Ezt az optimális beállítás az élkeresési algoritmushoz használjuk fel. Az élkeresési algoritmust a fókuszált folyadéksugár szabályzásánál használjuk fel, melyet részletesebben a 3.2.3. fejezetben tárgyalunk. A későbbiekben (3.2.5. fejezet) részletezésre kerül egy olyan optimális beállítás is, mely során a sejtek a csatorna egy szakaszában szabad szemmel érzékelhetőek.

Folyadék	Áramlási ráta
Desztillált víz az <i>A</i> jelű pumpából	32 $\mu\text{l/s}$
Desztillált víz a <i>B</i> jelű pumpából	32 $\mu\text{l/s}$
Vér a Graseby fecskendő pumpából	7 $\mu\text{l/s}$

3.2. táblázat. Optimális áramlási ráták élkeresési algoritmushoz

3.2.2. Vörösvértetek optikai tulajdonságainak módosítása

A méréseink során azt vizsgáltuk, hogy milyen arányú vér-Hayem-oldat keverék esetén lehet a legnagyobb intenzitás-eltérést detektálni. A hígítás aránya – Bürkert kamrás sejtszámlálás esetén – jellemzően 1:100, esetenként 1:200. A mérések során végül 1:100 arányú keveréket alkalmaztunk. Sűrűbb keverék (pl.: 1:50 arányú) esetén a sejtek csoportokba szerveződve, egymáshoz szorosan tapadva áramlanak, így számlálásra alkalmatlanná válnak a lézerefény számára.

3.2.3. A hidrodinamikai fókuszálás szabályzása

A lézerefényt egy illesztőnyakon keresztül vezetjük a chipre. Mivel a lézerefény pozíciója az optikai elrendezésből adódik, a tárgyasztal mozgatásával pozicionáltuk a lézerefényt a csatorna közepére. A végső, precíz beállítás kézzel nehezen végezhető el, ezért erre egy PID szabályzót használunk, ami a fókuszált sugár helyzetét a kívánt pozícióba mozgatja.

Jelenleg a szabályzáshoz a következő eljárást használjuk fel:

- Beállítjuk a lézerefényre a fókuszálás elvárt középpontját a kamera képe alapján.
- A reagenst adagoló pumpát, valamint az egyik bufferágot állandó áramlási rátával hajtjuk meg.
- A profil középvonalát visszamérjük a kamera képe alapján, és a másik bufferágot az eltérés alapján egy PID szabályzóval állítjuk.

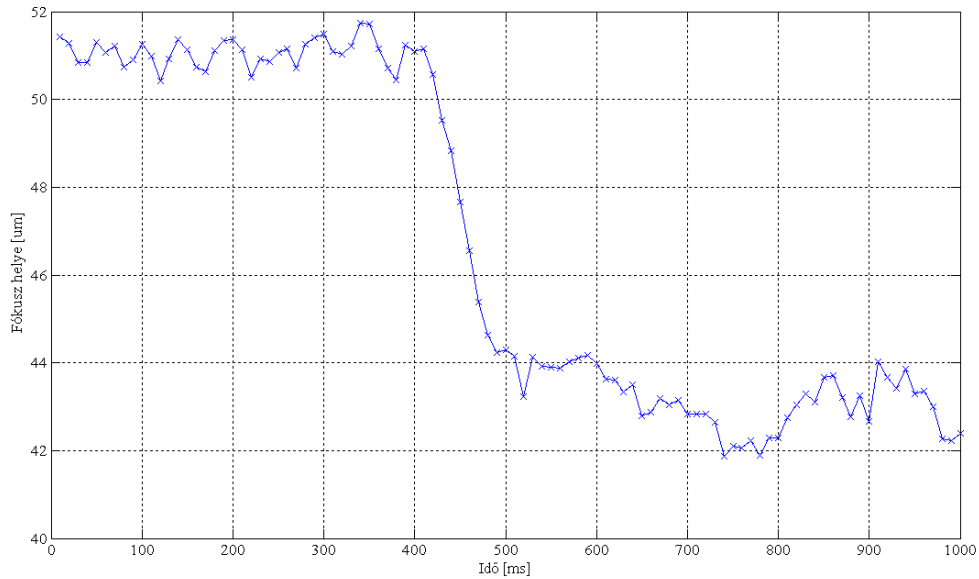
A hidrodinamikai fókuszálás során a fókuszálás mértékét a folyadékok össz áramlási rátája határozza meg, a fókuszálás pozícióját pedig a buffer folyadékok áramlási rátájának aránya. A rendszer szabályzását úgy valósítottuk meg, hogy az egyik pumpát fix sebességen hajtottuk (32 $\mu\text{l/s}$), míg a másik pumpa sebességét szabályoztuk. Ezzel a szabályzással ugyan a fókuszálás mindkét paraméterét módosítjuk, azonban ez jelentős változást nem okoz a csatorna szélességét tekintve, így továbbra is csak egyesével haladhatnak át a sejtek a fókuszált csatornán. A középvonal 14 $\mu\text{l/s}$ ugrás esetén a 3.1. ábrán látható válaszfüggvényt adja, melynek beállási ideje 90 ms. Az identifikált rendszer átviteli függvénye

$$W(s) = \frac{14}{1 + 0,09s}. \quad (3.1)$$

A rendszer identifikációjáról bővebben lásd az erről készült jegyzőkönyvet.

A PID szabályzó tervezése esetén az I taggal az időállandót ejtjük ki. A P és D tagokat tapasztalati úton igazítottuk az I taghoz. A felhasznált PID paraméterek tehát:

- P – 1



3.1. ábra. Rendszer ugrásválasza

- I – 0,013 min
- D – 0

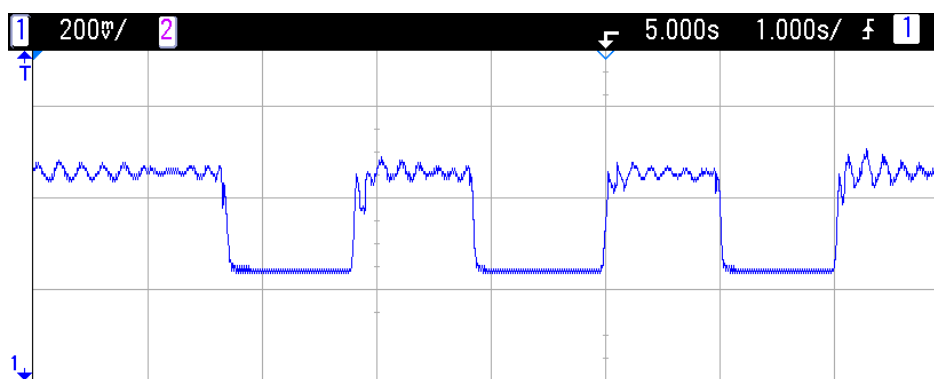
A szabályzó segítségével sikerült lecsökkenteni a beállási időt 80 ms-ra. A szabályzó csupán adott méretű fecskendőre lett implementálva. A szabályzás tökéletesítése MIMO szabályzást igényel, mely figyelembe veszi a fókuszált sugár szélességét is. Ennek megvalósítása későbbi munkánk célja.

3.2.4. Kísérleti mérések lézerrel

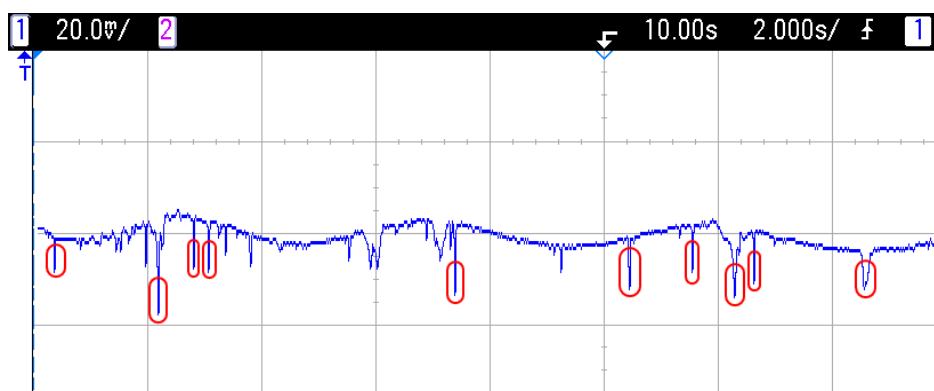
Első kísérletünk során a fókuszált csatorna lézeres átvilágításával próbáltuk a sejteket detektálni. A fotodiódát az optikai méretezés (2.1.3. fejezet) alapján helyeztük el a csatorna alatt. A méréseink során azt vártuk, hogy a sejtek által kitakart lézerfény intenzitása lecsökken, így az intenzitásváltozásból sejtek jelenlétére lehet következtetni. A mérések során a detektor erősített jelét oszcilloszkópon vizsgáltuk. A fotodiódás mérések során a teljesen kitakart lézersugár és a direkt megvilágítás között 2 mV különbséget tapasztaltunk. Ez az érték a környezeti zajokkal, így nem alkalmazható a kívánt feladat elvégzésére.

Második módszer esetében fototranzisztort alkalmaztunk a fotodióda helyett. A fototranzisztornak nagyobb az érzékenysége, és felhasználható a már megépített erősítőkapcsolásban. A direkt megvilágítás és a teljesen kitakart lézer között 200 mV különbséget érzékeltünk. Ez a felbontás már alkalmas méréseinkhez.

Első mérésünk során azt vizsgáltuk, hogy a diffúzió hatására áramló folyadék (ami víz és Hayem-oldatos vér) milyen változást okoznak a fototranzisztorral vizsgált lézerfény intenzitásában. Erről a mérésről készült oszcilloszkóp ábrán látható. Azt tapasztaltuk, hogy a zajtól jól elkülöníthető körülbelül 20 – 25 mV a feszültségváltozás.



3.2. ábra. Fototranzisztor érzékenysége a teljes lézertartományban



3.3. ábra. Diffúziós áramlás hatása az intenzitásra

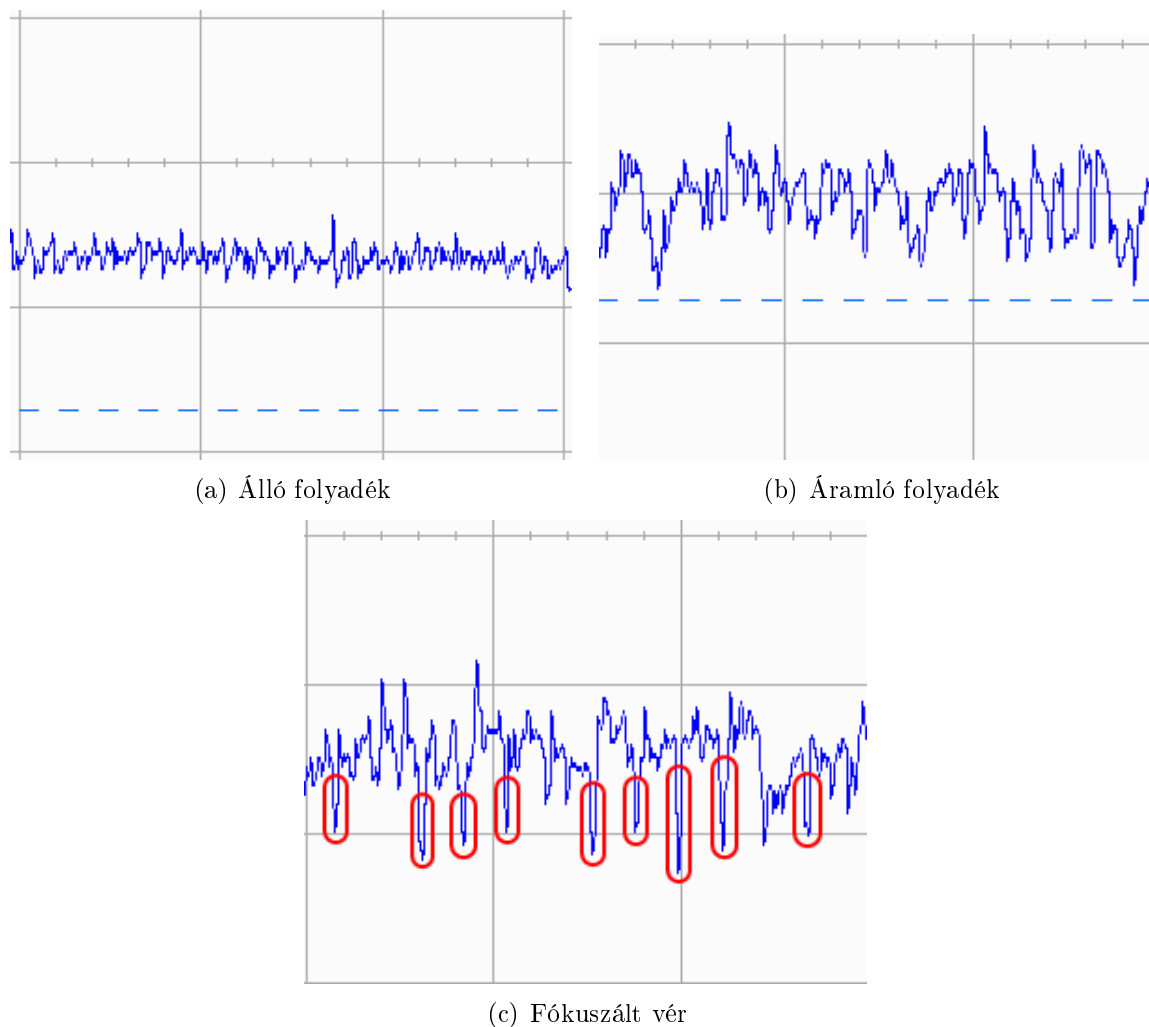
Ezek után megvizsgáltuk, mi okozhatja a tapasztalt tüskeszerű impulzusváltozásokat. A kiindulási feltételezés az volt, hogy az áthaladó alakos elemek következményei. A vizsgalatot indirekt módszerrel végeztük, először álló és vérmentes folyadékon, majd mozgó vérmentes folyadékon, végül mozgó, fókuszált vért tartalmazó folyadékon.

Álló folyadék esetén a 3.4(a) ábrán látható jelet mértük. Ezen a jelen nem tapasztaltunk hasonló amplitúdójú tüskéket az intenzitásban. A detektált jel valószínűleg a környezeti zaj volt.

A következő lépésben a desztillált vizet áramoltattuk a csatornában, 3.4(b) ábra. Ekkor a mért jel amplitúdóváltozásai nagyobbak voltak az álló folyadékban mért jelhez képest. Ugyanakkor még ekkor sem tapasztaltuk azokat a jól elkülöníthető amplitúdójú letöréseket amelyet a diffúz áramlás esetén mértünk.

Harmadik lépésként vért fókuszáltunk a csatornában. A fókuszált csatornát pontosan a lézertény pozíciójához igazítottuk. A 3.4(c) ábrán látható jelet mértük, amiben megjelentek azok a 20 – 25 mV amplitúdójú változások (lásd a 3.3. és a 3.4(c). ábrán vörössel jelölt szakaszokat), melyeket a diffúz áramlás során mértünk. Az amplitúdóváltozások frekvenciája körülbelül 22 kHz volt. Az eredmény eltér attól az 1,6 kHz-es értéktől melyet vártunk, ez valószínűleg a modellezés során elvégzett jelentős elhanyagolások következménye. A jelenség vizsgálata további méréseket igényel.

A jelen észrevehető volt, hogy nem minden tüske ugyanakkora amplitúdójú. Elképzelhető, hogy a vörösvértesteken kívül a vér egyéb alakos elemeit is detektáltuk. Ennek vizsgálata további méréseket igényel, egy érzékenyebb rendszer segítségével. A rendszer



3.4. ábra. Lézer intenzitásának vizsgálata

érzékenysége növelhető APD, vagy nagyobb intenzitású lézer alkalmazásával. A szenzor erősítő áramkörének nyomtatott huzalozású lemezen történő kialakítása tovább csökkentené a zajt.

3.2.5. Kísérleti mérések kamera segítségével

A lézeres kísérletek után megpróbáltuk a sejteket a kamera élő képének segítségével detektálni. Az alkalmazott áramlási rátákkal a 3.5. ábra szerint módosult az áramlás

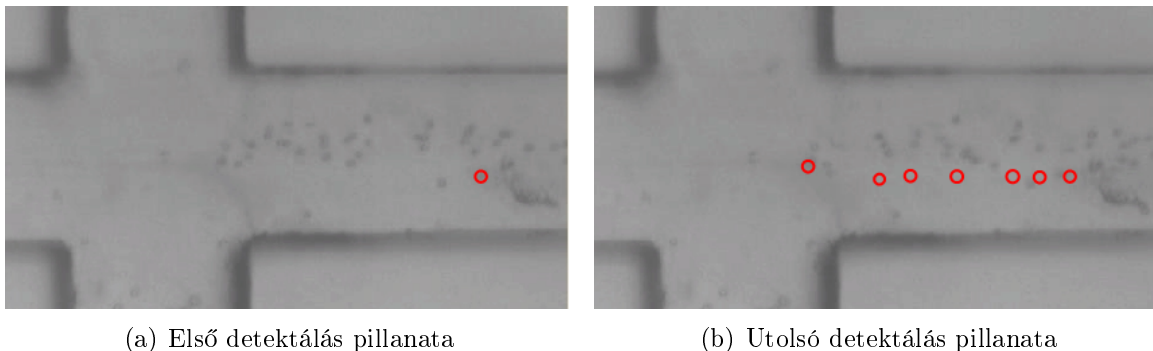
Folyadék	Áramlási ráta
Desztillált víz az <i>A</i> jelű pumpából	0,688 $\mu\text{l/s}$
Desztillált víz a <i>B</i> jelű pumpából	0,688 $\mu\text{l/s}$
Vér a Graseby fecskendő pumpából	0,01 $\mu\text{l/s}$

3.3. táblázat. Áramlási ráták alakfelismeréshez

képe. Az ábrákon optikailag jól elkülöníthetőek az egyes vörösvértestek. A méréshez készítettünk egy olyan kameraszoftvert, amely egy másodperc alatt száz képkockát

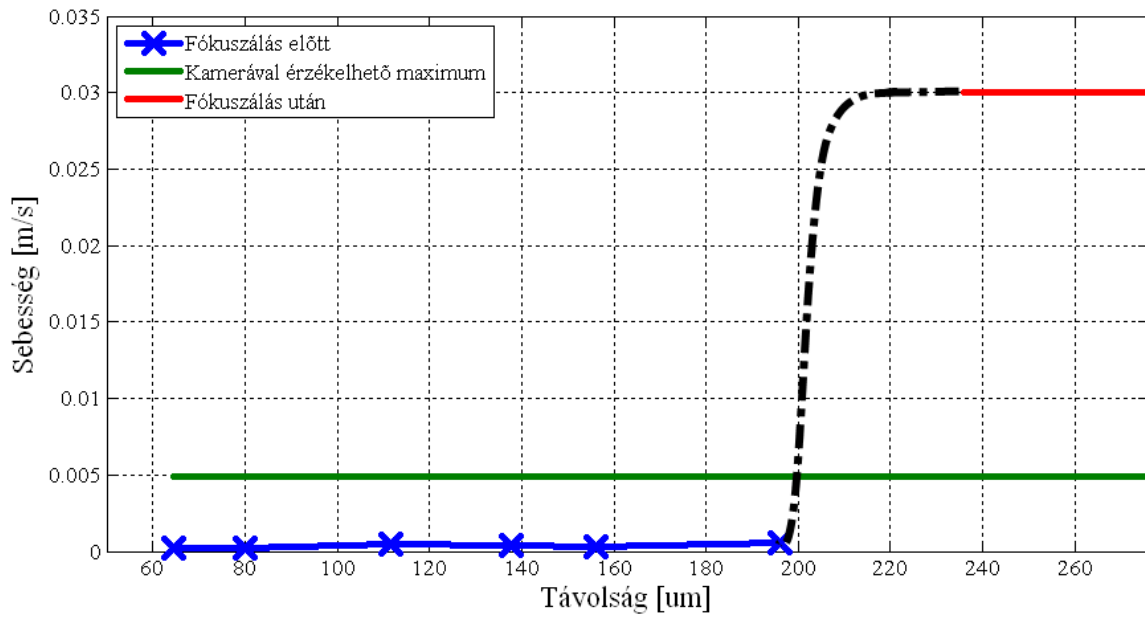
rögzít, melyeket egyenként elment. A program segítségével 70 ms-onként történt a képek frissítése. Ezeken azt vizsgáltuk, hogy a sejtek milyen sebességgel haladnak, illetve azt, hogy mennyi idő alatt gyorsulnak fel olyan sebességre, hogy az emberi szem, illetve a kamera 100 Fps-es frissítési frekvenciája is kevésnek bizonyuljon az egyenkénti detektálhatóság szempontjából. Ezt követően az elkészített képeken kiszemeltünk egy sejtet, majd pontosan megmértük hogyan változik a sebessége, a csatorna mentén, a fókuszálás pillanatáig.

A kamera 100 Fps-es sebesség mellett, akkor képes érzékelni egy sejtet, ha 640 pixel-nél – ami nagyjából $490\ \mu\text{m}$ – kevesebb távolságot tesz meg 10 ms alatt. Ez $49 \cdot 10^{-3}\ \text{m/s}$ -os sebességnek felel meg. A fókuszált sugár sebességét a 3.3. táblázat értékei, és az előző fejezetben ismertetett modell alapján számoltuk ki, ez $0,03\ \text{m/s}$. A 3.5. ábrán bejelöltük, hogy egy sejt első érzékelésének a pillanatától az utolsó érzékelhető pillanatig – amikor bekerül a fókuszált csatornába –, milyen pozíciókban detektáltuk. Nulla pozíciónak a csatorna jobb szélét választottuk. Az így kiszámolt sebesség és távolság értékeket 3.6. ábrán látható grafikonon ábrázoltuk. Az ábrán szintén bejelöltük, hogy maximum meddig lenne lehetséges a kamerával való detektálás. A fókuszálás előtti és utáni sebességértékek között fennálló függvénykapcsolatot nem tudtuk pontosan meghatározni, ez további vizsgálatokat igényel. Azonban ahol még a képkockánkénti felvételen is láttuk a sejteket, az a csatorna jobb szélétől számítva $195\ \mu\text{m}$ volt, itt körülbelül $17\ \mu\text{m}$ széles volt a fókuszált sugár. A legkedvezőbb esetben is két sejt férne így el egymás mellett, így tehát 100%-os hibát vétenénk, a módszert ezért elvetettük.

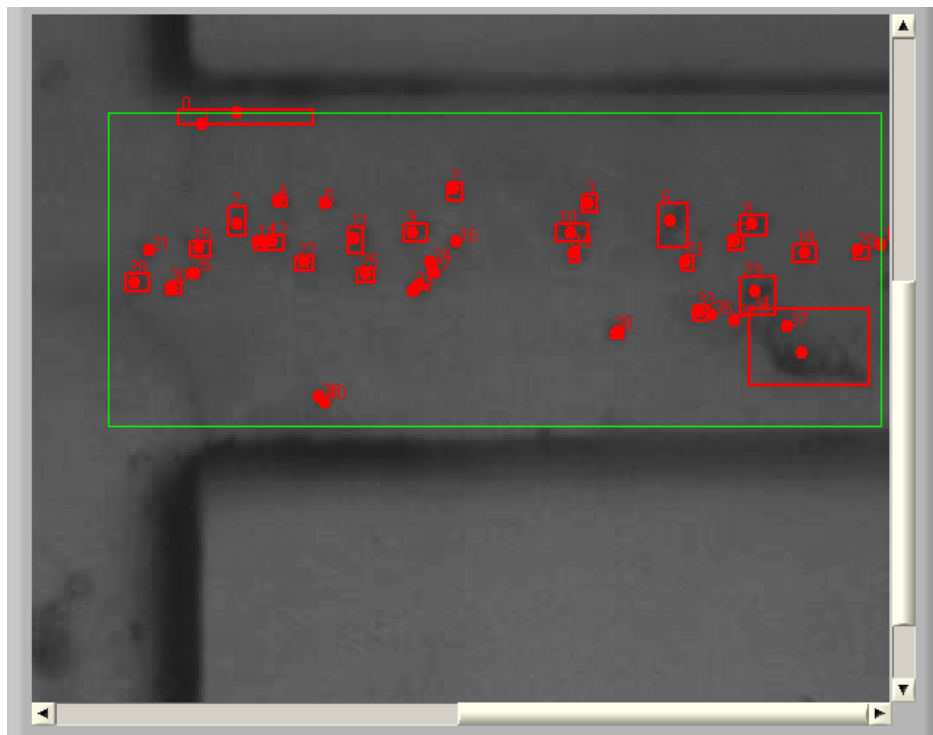


3.5. ábra. Egy kiválasztott sejt haladása

A LabVIEW képfeldolgozási eszköztárában olyan alakfelismerő eszköz áll rendelkezésre, amely az egyes tartományok nagy színeltérése alapján feltételez különböző objektumokat. A 3.7. ábrán a fókuszálatlan csatornában detektált sejteket láthatjuk. Ez az alakfelismerési módszer akkor jelenthet hibát, ha a sejtek nagyon közel, vagy egymáshoz tapadva haladnak, ugyanis ekkor a sejtek nem különíthetők egyértelműen, ami a végső összegzés során hibát eredményez. Ezzel az alakfelismerő eszközzel a csatornában lévő áramlási viszonyokról is megfelelő képet alkothattunk. A kamerával, a már említett szoftver segítségével, 100 képet rögzítettünk. Azt vizsgáltuk, hogy alkalmazható lenne-e a LabVIEW alakfelismerő algoritmusra erre a célra. Méréseink eredményeképpen elmondható, hogy a csatorna széles szakaszában a sejtek szorosan egymáshoz tapadva haladhatnak, így az alakfelismerő nem tudja elkülöníteni ezeket a csoportokat. Az egyes sejtcsoportokat egy sejtnek érzékeli. A módszer hosszú távon hibát eredményezhet a pontos összegzés során.



3.6. ábra. Mérési eredmények kamerával történő érzékeléshez



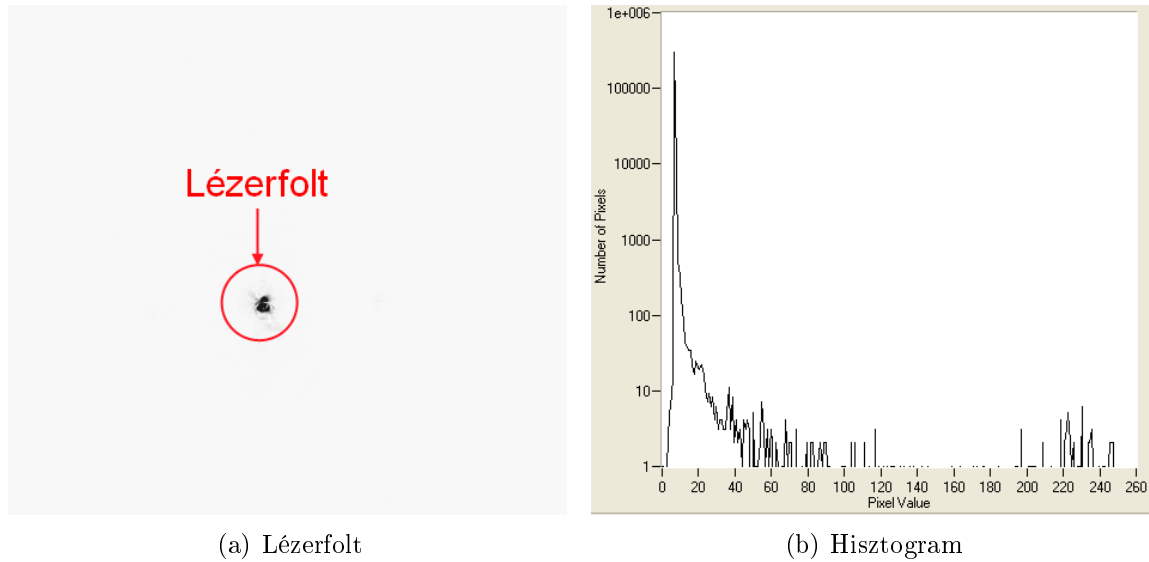
3.7. ábra. Mérési eredmények kamerával történő alakfelismeréssel

3.2.6. Kísérleti mérések reflektált lézertény histogramja alapján

A sejtek detektálását egy másik képfeldolgozási módszerrel is megkíséreltük. A csatornát megvilágító lézertény histogramját vizsgálva próbáltunk a sejtek jelenlétére következtetni. Ez a módszer tehát bizonyos mértékben az irodalomban is széleskörűen

alkalmazott a sejteken bekövetkezett fénytörésen alapul.

A hisztogram egy olyan diagram mely tartalmazza, hogy az egyes színárnyalatokból milyen mennyiségben található a képen. Esetünkben 256 szürkeárnyalat áll rendelkezésre. A hisztogramot nem a teljes képre vettük fel, hanem csak a képnek arra a részére, amelyen a csatornára fókuszált lézerfolt látszik. A csatorna közepére fókuszált lézersugár a monokróm képen fehér, élesen elkülönül a csatornától. Az alapötletünk az volt, hogy az áthaladó sejt kitakarja a lézersugarat, így a hisztogramban sötét árnyalatú komponensből nagyobb mennyiség jelenik meg a hisztogramban, míg a fehér komponens lecsökken.



3.8. ábra. Hisztogramos vizsgálat eredményei

Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy csatorna közepére fókuszált lézersugár körül gyűrűk jelennek meg, 3.8(a) ábra. Ezek a gyűrűk nem egyenletesek, jól észrevehető zajt eredményeznek a hisztogramban, 3.8(b) ábra. Először azt az esetet vizsgáltuk, hogy hogyan változik a hisztogram, ha a sejtekkel teli csatornára, illetve az üres csatornára irányítjuk. A két mérés során keletkezett hisztogramok nem mutatottak észrevehető eltérést átlagolás után sem. A zaj mértéke vélhetően összemérhető volt a változással melyet egy sejt okoz a hisztogramon. A hisztogramot kezdetben az üveg-PDMS-üveg szendvics struktúrájú chip-en vizsgáltuk. Rendelkezésünkre állt egy másik chip is, mely üveg-PDMS-szilícium szendvics struktúrájú. Mivel a szilícium felületéről jól reflektálódik a lézerfény azt vártuk, hogy a rendszer érzékenysége növelhető ebben az elrendezésben. A szilíciumon tükröződő lézersugár hisztogramját vizsgálva a már említett a szóródási gyűrű figyelhető meg. Ismét elvégeztük a már említett méréseinket, azonban ugyanazt a jelenséget tapasztaltuk mint korábban.

4. fejezet

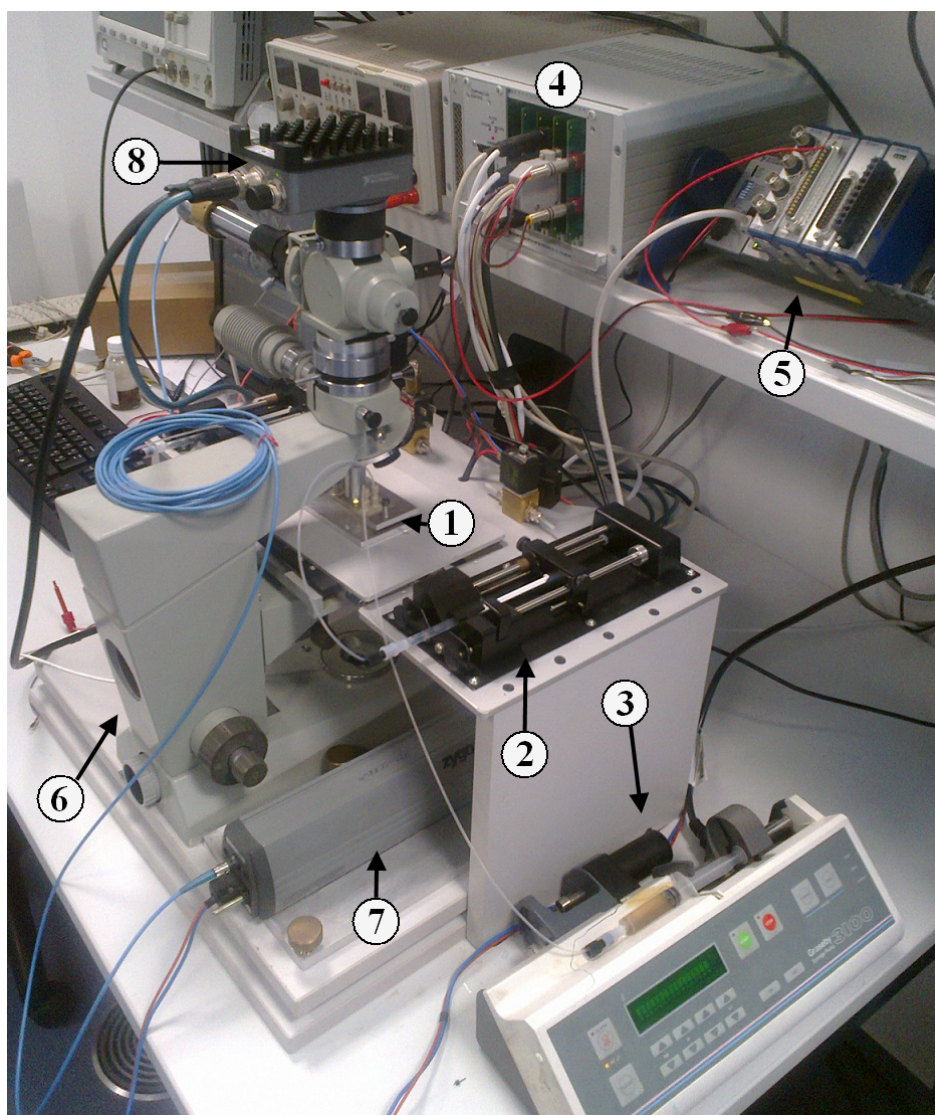
Konklúzió és továbblépési lehetőségek

Dolgozatunkban a mikrofluidika egy gyakorlati alkalmazását mutattuk be. Az irodalomkutatás alapján olyan mérőrendszert alakítottunk ki, mely alkalmas sejtszámlálási feladat elvégzésére. A sejtek detektálására három különböző módszert dolgoztunk ki. Az alakfelismerés a sejtek gyors áramlása miatt nem valósulhatott meg, míg a hisztogramos módszer a lézertény szóródásából származó zaj miatt hiúsult meg. Az élőképalapú számlálási módszereket elvetettük. Ugyanakkor lézeres megvilágítással sikerült az alakos elemek detektálása.

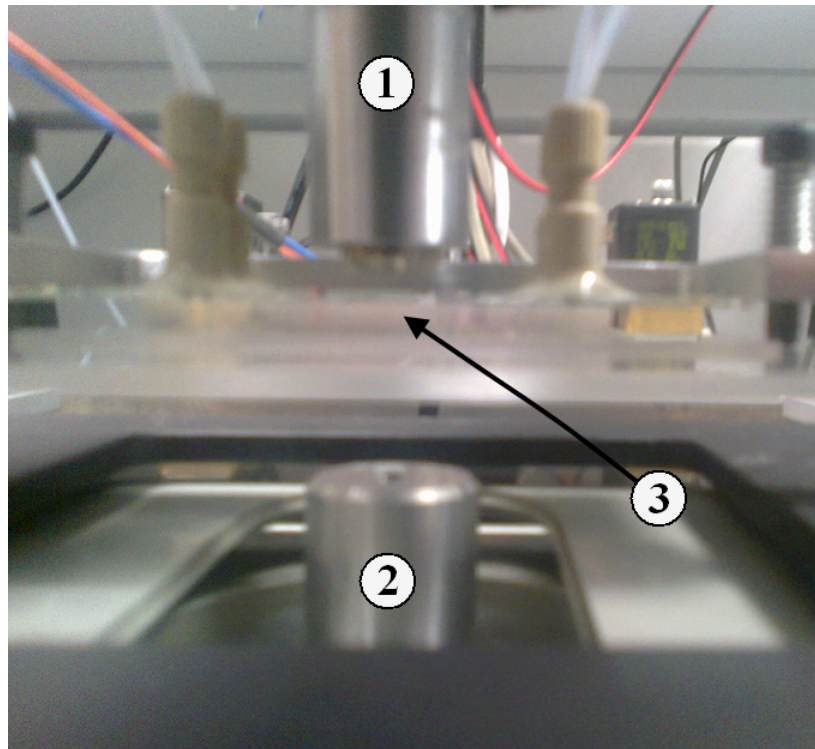
A jövőben a mérés alábbi paramétereit kívánjuk pontosítani. Szeretnénk detektálással pontosan elkülöníteni a vörös vértesteket a vér többi alakos elemétől. A hidrodinamikai fókuszálás szabályzásához készített PID szabályzó helyett egy MIMO szabályzó tervezését helyezük kilátásba. A meglévő mérőrendszer érzékenységét APD és nagyobb teljesítményű lézerrel kívánjuk megnövelni. Szimulációs módszerek segítségével szeretnénk megvizsgálni a háromdimenziós fókuszálás lehetőségeit. A mérések során alkalmazott modelleket további szimulációk segítségével kívánjuk pontosítani. Így a kétdimenziós fókuszálási rendszereket szimuláció útján is mélyrehatóbban megvizsgál-nánk. A detektorhoz egyedi nyomtatott huzalozású áramkör tervezését szorgalmazzuk, mellyel a zajvédeltséget szeretnénk növelni. Célunk emellett a felhasználói szoftver továbbfejlesztése.

A. Függelék

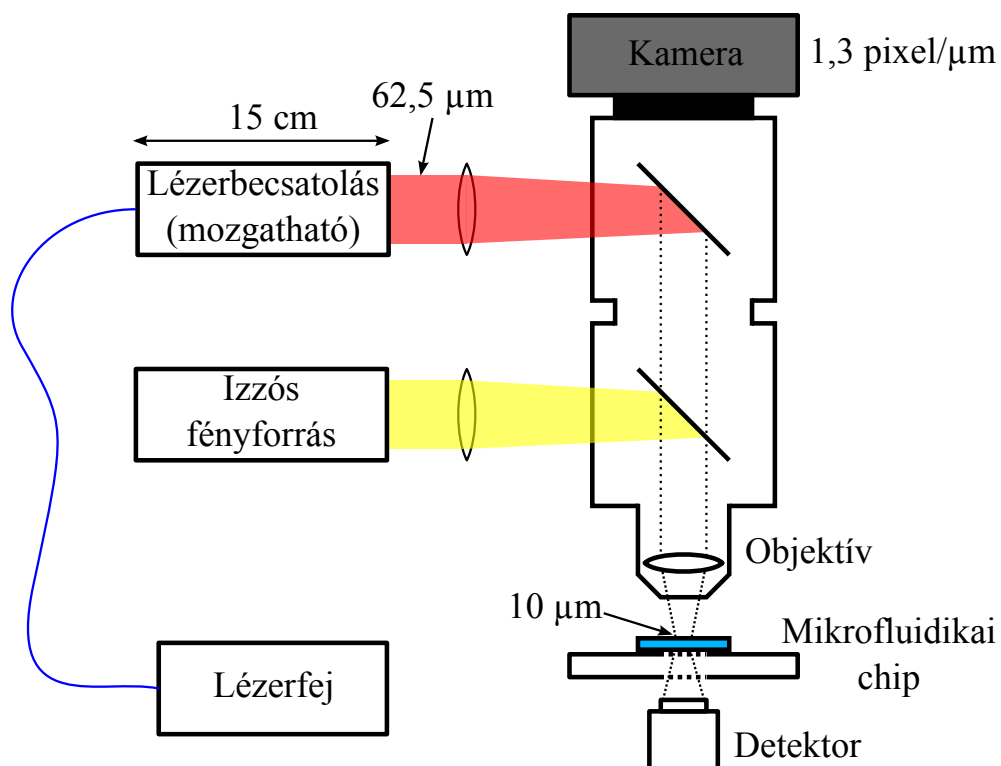
Fényképek



A.1. ábra. Mikrofluidikai mérőkörnyezet: (1) mikrofluidikai chip, (2) fecskendő pumpa, (3) Graseby fecskendő pumpa, (4) Hardvervezérlő egység, (5) NI: cRIO, (6) mikroszkóp, (7) lézer, (8) NI: smart camera



A.2. ábra. Szenzor elhelyezése a fókuszált chip alatt:(1) mikroszkóp objektívje, (2) detektor, (3) fókuszáló chip



A.3. ábra. Optikai elrendezés

B. Függelék

CD melléklet tartalma

A mellékelt CD-n az alábbiak találhatóak:

- jelen dolgozat pdf formátumban,
- elektronikus formátumban rendelkezésre álló felhasznált irodalom,
- felhasznált eszközök adatlapjai,
- mérésvezérlő szoftver forráskódja és dokumentációja,
- mérések során készített mérési jegyzőkönyvek,
- mérőrendszerről és az eszközökről készített fényképek.

Ábrák jegyzéke

1.1.	Áramlástípusok	2
1.2.	Nyomáskülönbség segítségével létrehozott áramlás	3
1.3.	Folyadékok keveredése „T” elágazásban	4
1.4.	Két-dimenziós hidrodinamikai fókuszálás	5
1.5.	Fotoelektron szorzó működésének vázlata	6
1.6.	Fotodióda működésének vázlata	7
1.7.	Citometria által vizsgált fényjelenségek[13]	7
1.8.	15° és a 45°-os szögekben megtört fény intenzitása	8
1.9.	Pamme-féle mérés[11]	8
1.10.	Kis- és nagy szögű fénytörés vizsgálata vérteteknél	9
1.11.	Fényjelek alakulásának elméleti vázlata[13]	10
1.12.	Fluoreszkálás és fénytörés jeleinek elválasztása	11
1.13.	Fluoreszkálás és fénytörés detektálása	12
1.14.	Merőleges megvilágítású mikrocatorna vázlata[16].	12
1.15.	Coulter számláló	13
2.1.	Az automatikus diagnosztikai berendezés rendszerterve	15
2.2.	CompactRIO-9073-as vezérlőegység és a mérőkártyák	17
2.3.	1772 Smart Camera	18
2.4.	A fotodióda és a hozzátartozó erősítőkapcsolás	20
2.5.	Alkalmazott érzékelők	20
2.6.	A csatorna CAD rajzának részlete	23
2.7.	A szendvics struktúrájú chip vázlata	23
2.8.	Mérésvezérlő szoftver rendszerterve	24
2.9.	Mérésvezérlő szoftver forráskódja	26
2.10.	Élkeresés a kamera segítségével	28
2.11.	Megjelenítési módok szemléltetése	30
3.1.	Rendszer ugrásválasza	34
3.2.	Fototranzisztor érzékenysége a teljes lézertartományban	35
3.3.	Diffúziós áramlás hatása az intenzitásra	35
3.4.	Lézer intenzitásának vizsgálata	36
3.5.	Egy kiválasztott sejt haladása	37
3.6.	Mérési eredmények kamerával történő érzékeléshez	38
3.7.	Mérési eredmények kamerával történő alakfelismeréssel	38
3.8.	Hisztogramos vizsgálat eredményei	39
A.1.	Mikrofluidikai mérőkörnyezet	V
A.2.	Szenzor elhelyezése a fókuszált chip alatt	VI

A.3. Optikai elrendezés	VI
-----------------------------------	----

Táblázatok jegyzéke

1.1. Skálázási törvények	2
1.2. Irodalomkutatást összefoglaló táblázat	14
2.1. ZYGO 7705 típusú lézer jellemzői	19
2.2. Hamamatsu S10784 típusú szenzor jellemzői	19
2.3. Osram BPX43 típusu fototranzisztor fontosabb tulajdonságai	21
2.4. Élkeresés kiinduló értékei	28
3.1. Áramlási rátákkal végzett mérések beállításai és megfigyelései	32
3.2. Optimális áramlási ráták élkeresési algoritmushoz	33
3.3. Áramlási ráták alakfelismeréshez	36

Irodalomjegyzék

- [1] P. Tabeling, *Introduction to Microfluidics*, Oxford University Press, USA, 2005
- [2] J. Berthier, P. Silberzan, *Microfluidics for Biotechnology*, Artech House, Norwood, 2010
- [3] J. G. Baun, *Vascular Ultrasound : Physics, Instrumentation, and Hemodynamics*, ProSono, USA, 2012
- [4] N. Rott, „Note on the history of the Reynolds number”, *Annual Review of Fluid Mechanics*, 22 (1), pp. 1–11, 1990
- [5] http://www.engineeringtoolbox.com/hydraulic-equivalent-diameter-d_458.html, Megtekintve 2012.10.03
- [6] J. Philibert, „One and a Half Century of Diffusion: Fick, Einstein, before and beyond”, *Diffusion Fundamentals 2*, pp 1.1–1.10, 2005
- [7] T. M. Squires et. al., „Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale”, *Reviews of Modern Physics*, Volume 77, No. 3, 2005
- [8] A. Heeren et. al., „Diffusion along microfluidic channels”, *Microelectronic Engineering 83*, pp. 1669–1672, 2006
- [9] Nagy Gábor, Vincze Árpád, „A PIN dióda alkalmazása napjainkban”, *Hadmérnök*, II. évfolyam, 4. szám, pp. 25–37, 2007
- [10] Szentiday Klára, Zólmoy Imre, „Lavina fotodiódák multiplikációs tényezőjének mérése”, *Híradástechnika*, XXV. évfolyam, 3. szám, pp. 91–93, 1974
- [11] N. Pamme et. al., „Counting and sizing of particles and particle agglomerates in a microfluidic device using laser light scattering: application to a particle-enhanced immunoassay”, *Lab on a Chip*, 3, pp. 187–192, 2003
- [12] E. Altendorf et. al., „Differential Blood Cell Counts Obtained Using a Microchannel Based Flow Cytometer”, *International Conference on Solid-state Sensors and Actuators Chicago* , pp. 531–534, 1997
- [13] Z. Wang et. al., „Measurements of scattered light on a microchip flow cytometer with integrated polymer based optical elements”, *Lab on a Chip*, 4, pp. 372–377, 2004
- [14] D. P. Schrum et. al., „Microchip Flow Cytometry Using Electrokinetic Focusing”, *Analytical Chemistry*, Volume 71, No. 19, pp. 4173–4177, 1999

- [15] C. Mu et. al., „Highly efficient dual-channel cytometric-detection of micron-sized particles in microfluidic device”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 151, pp. 402–409, 2011
- [16] J. H. Nieuwenhuis et. al., „Near-Field Optical Sensors for Particle Shape Measurements”, *IEEE Sensors Journal*, Volume 3, No. 5, pp. 646–651, 2003
- [17] Koch et.al., „Design and fabrication of a micromachined Coulter counter”, *Journal of Micromechanics and Microengineering* , 9, pp. 159–161, 1999
- [18] Hantos Gusztáv, „*Hidrodinamikai fókuszálás előállítása és szabályozása mikrofluidikai környezetben*”, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Diplomaterv, 2011
- [19] W. F. Ganong, „*Az orvosi élettan alapjai*”, Medicina Kiadó, Budapest, 1990
- [20] Szentágothai János, Réthelyi Miklós, „*Funkcionális anatómia*”, Semmelweis Kiadó, Budapest, 1994
- [21] Went István, „*Élettan*”, Medicina Kiadó, Budapest, 1962