

Mikrofluidikai rendszer tervezése a von Willebrand-faktor aktiválásának vizsgálatára

Kovács Rebeka, Borók Alexandra

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Villamosmérnöki és Informatikai Kar, Elektronikai Technológia Tanszék
1111 Budapest, Egrý József utca 18.
E-mail: kovacsrebeka@edu.bme.hu

Tartalmi kivonat. A von Willebrand-faktor (vWF) a vérben található legnagyobb glikoprotein, amely meghatározó szerepet játszik az elsődleges vérzéscsillapítás egyik kulcsreakciójában: biztosítja a sérült érfal és a vérlemezkék közti kötődést és elősegíti a trombocita kitapadást. Megváltozott nyírófeszültség hatására a fehérje konformációváltozáson megy keresztül, ami a faktor aktiválódásához vezet. Annak érdekében, hogy vizsgálhassuk a nyírófeszültség vWF-re gyakorolt hatását egy egyedi mikrofluidikai rendszer terveztünk. A mikrofluidikai csatornában a folyadékok áramlási sebességét tudjuk szabályozni, a fellépő nyíróerők meghatározásához kétdimenziós és háromdimenziós modelleken végeztünk numerikus szimulációkat. Cikkünkben a csatornageometria és áramlási sebességek hatását mutatjuk be a kialakuló nyíróerőkre, a numerikus szimulációk eredményein keresztül.

Kulcsszavak: mikrofluidika; numerikus modellezés; számítógépes szimuláció; von Willebrand-faktor; nyírófeszültség

1. BEVEZETÉS

1.1. A von Willebrand-betegség és faktor

A von Willebrand-betegség (vWB) az egyik leggyakoribb öröklött véralvadási betegség, amely 10000-ből 1 embert érint [1]. A legjellemzőbb tünetei közé a bőr- és nyálkahártyavérzések, gyakori orrvérzés, műtét utáni vérzések tartoznak. Emellett a betegek bőrén apró traumák által okozott véraláfutások jelenhetnek meg. A hemofiliától eltérően – amely csak férfiaknál jár tünetekkel [2] – nőknél is előfordul a betegség. A szülés során kialakuló vérzéses komplikációk komolyabb problémákat okozhatnak. A szindróma a megakaryocyták és endotél sejtek által termelt von Willebrand-faktor (vWF) mennyiségi csökkenéséhez és működésében fellépő hibákhoz köthető [3].

Normál körülmények között a vWF és a vérlemezkék között nincs kapcsolat, azonban érrendszeri sérülések esetén az áramlási körülmények (megemelkedett nyírófeszültség) megváltozása a vWF konformációváltozását eredményezi. Az aktiválódott vWF a kötőszövetekhez és vérlemezkékhez kapcsolódva közvetíti a vérlemezke-adhéziót; illetve a FVIII-as véralvadási faktor stabilizálásáért is felel [4].

1.2. A von Willebrand-faktor aktiválása

A von Willebrand-faktor aktiválása kémiai úton risztocetin reagens segítségével érhető el. Kutatásunk célja a mikrofluidikai csatornában végzett kísérletek áramlási körülményeinek vizsgálata számítógépes szimulációk segítségével; illetve annak vizsgálata, hogy a csatornában kialakuló nyírófeszültség képes-e aktiválni a faktort.

1.3. Számítógépes folyadékdinamikai módszerek

A mikrofluidika tudományága teszi lehetővé a mikroliterestől pár száz mikroliterig terjedő csatornarendszerekben a fluidumok vizsgálatát, azonban a csatornában kialakuló nyírófeszültség közvetlen mérése nehezen megvalósítható. A nyírófeszültség-eloszlása mikrofluidikai eszközökben vékony, rugalmas mikropillérek elhajlása alapján mérhető, viszont ezek befolyásolják a kapott nyírófeszültség értékeket [5]. Ezért ez a módszer nem minden esetben eredményes. Ezekben az esetekben végeselemes folyadékdinamikai szimulációk (Computational Fluid Dynamics, CFD) alkalmazandók. A CFD használatával lehetővé válik a folyadék mozgásának, viselkedésének rekonstruálása annak érdekében, hogy a mikrofluidikai cellában létrejövő áramlási körülményeket jobban megismerjük [6].

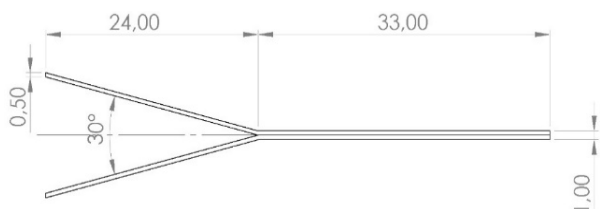
A 3D-tervezés előnye, hogy a geometriai kialakítások az igényeknek megfelelően könnyen alakíthatóak, újratervezhetőek, ezáltal a fejlesztés ideje jelentősen lecsökkenthető.

A nyírófeszültség vWF-re való hatásának vizsgálatát kétdimenziós és háromdimenziós CAD mikrofluidikai csatorna modellek tették lehetővé.

2. SZIMULÁCIÓS MÓDSZEREK

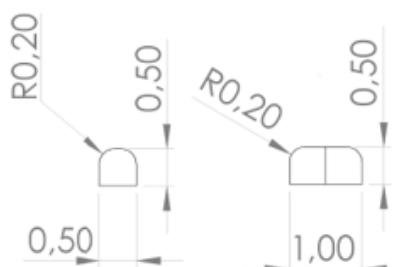
2.1. Geometriai tervek

A mikrofluidikai csatorna tervezésénél az egyszerű geometriai kialakítás volt a cél. A kétdimenziós modellekhez tervezett csatorna két bemeneti porttal rendelkezik, amelyek egy közös csatornává alakulnak. A bemeneti ágak 0,5 mm szélesek, amelyek találkozása 1 mm széles kimeneti ágat eredményez. A pontos geometriai terv az alábbi ábrán látható (1. ábra).



1. ábra. A kétdimenziós modell geometriája

A háromdimenziós modell alpméretei x-y irányban megegyeznek a kétdimenziós modellel. A keresztmetszeti méretek a 2. ábrán láthatók.



2. ábra. A háromdimenziós csatorna keresztmetszeti méretei

Ahhoz, hogy a szimulációk során pontosan megadhatóak legyenek az adott folyadékfázisokhoz tartozó csatornarészek a két folyadék találkozásánál ketté kell választani a csatornaszakaszt. Emellett a csatornarendszer szélének lekerekítése is megvalósult, annak érdekében, hogy a csatorna minél jobban közelítse egy ér keresztmetszeti képét. A cél az artéria modellezése, és két különböző tulajdonságokkal rendelkező folyadék összeengedése.

2.2. Szimulációk paraméterei

Az áramlási viszonyok megismeréséhez végzett végesselemez szimulációk a COMSOL Multiphysics 3.5 programmal valósultak meg.

A folyadékok áramlásának vizsgálatára a program a Navier-Stokes egyenletet használja:

$$\rho(\mathbf{u} \cdot \nabla)\mathbf{u} = \nabla \cdot [-p\mathbf{I} + \mathbf{K}] + \mathbf{F} \quad (1)$$

$$\rho \nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (2)$$

$$\mathbf{K} = \mu(\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T) \quad (3)$$

Ahol ρ [g/cm³] a sűrűség, η [Pa·s] a dinamikai viszkozitás, u [m/s] a folyadék áramlási sebessége, p [Pa] a nyomás, \mathbf{I} [-] az egységdiagonális mátrix, \mathbf{T} a feszültség tenzor, \mathbf{F} [N] a folyadék egységnyi köbtartalmára vonatkozó erő, és ∇ a nabla operátor.

A modellek esetén Multiphase flow → Two-phase flow, Phase field → Laminar flow került beállításra. A geometriákat az Adobe Illustrator programmal terveztük, majd importálás után megtörtént a két folyadék bemenetének és kimenetének pontos megadása. Emellett csúszásmentes határfeltétel került beállításra. A szimulációk elvégzéséhez a kétdimenziós modell esetén finom háromszöges, a háromdimenziós modell esetén tetraéderes hálót alkalmaztunk.

Az egyik bemeneten emberi vérplazma áramlott, amely sűrűsége $\rho = 1025$ kg/m³, dinamikai viszkozitása $\mu = 5,8$ mPa·s. A csatorna másik ágához a vízre jellemző tulajdonságokat rendeltük hozzá, amelynek sűrűsége $\rho = 997$ kg/m³, dinamikai viszkozitása 1,05 mPa·s. [7,8]

A csatorna egészén 293,15 K konstans hőmérséklet került beállításra. A folyadékok bemeneti áramlási sebességének (u_0) kezdetben az artériákban jellemző átlagos áramlási sebességet (0,3 m/s) adtunk meg, majd különböző áramlási sebességek nyírófeszültségre való hatását vizsgáltuk. A megadott kimeneti nyomásérték 0 Pa volt.

A nyírófeszültség az alábbi módon került kiszámításra:

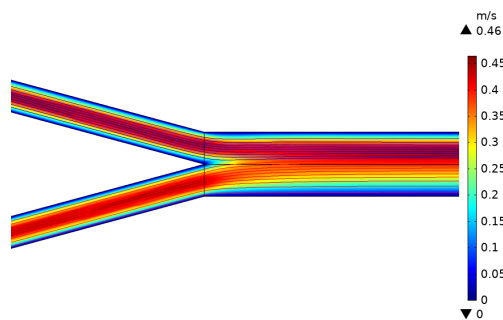
$$\tau = \eta \cdot \mu \quad (4)$$

ahol τ (Pa) a nyírófeszültség, μ (1/s) a nyírási sebesség, és η (Pa·s) a dinamikai viszkozitás. [9]

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. A kétdimenziós modell eredményei

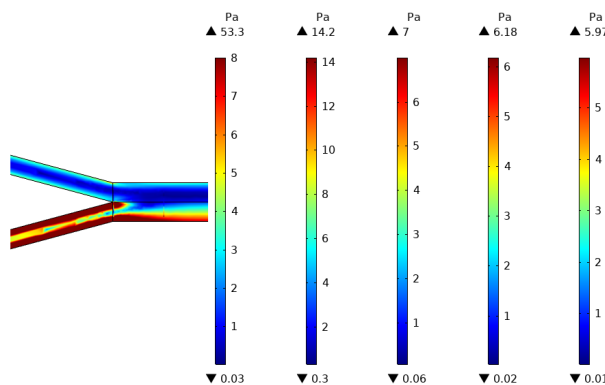
A szimuláció célja a csatornában kialakuló áramlási sebesség, nyírófeszültség meghatározása, és az áramvonalak vizsgálata. Az áramvonalakat és az áramlási sebességet a 3. ábra szemlélteti. A felső ágban víz, az alsóban vérplazma folyik.



3. ábra. Áramlási sebesség ($u_{v0} = u_{p0} = 0,3$ m/s) a kétdimenziós modellben

A csúszásmentes peremfeltétel miatt a csatorna fala mellett az áramlási sebesség értéke 0 m/s, míg a maximális sebesség 0,3 m/s bemeneti sebességek mellett (víz esetén u_{v0} , vérplazma esetén u_{p0} jelöléssel) 0,46 m/s. A két folyadék összeáramlása után a sebességprofil eltolódik a felső, vizet tartalmazó ág felé, illetve a vérplazma áramvonalai a középvonalat keresztezve haladnak. Ezek a jelenségek a két anyag különböző viszkozitása és sűrűsége miatt következnek be.

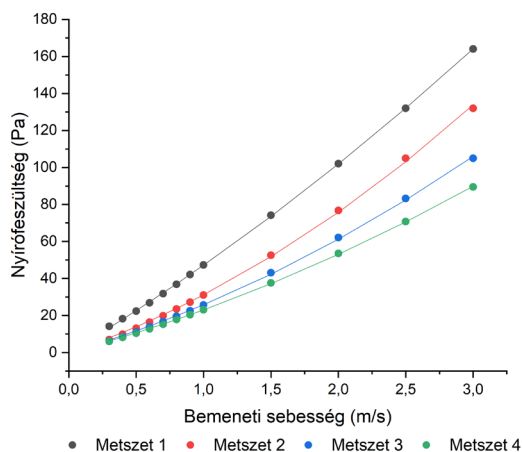
A maximális nyírófeszültség (53,3 Pa) a vérplazma bemeneténél mérhető. A két folyadék határán fellépő maximális nyírófeszültség meghatározását nehezíti, hogy a legmagasabb nyírófeszültség értékek mindig a modell falánál lesznek mérhetőek (ez a csúszásmentes határfeltétel miatt következik be), így a kapott maximális nyírófeszültség értéke nem ad megfelelő információt a csatorna belsejében fellépő feszültség értékekről. Emiatt a csatorna összefolyása után négy metszeti profilt határoztunk meg a csatorna mentén 0,1 mm; 1,3 mm; 2,5 mm; 4,5 mm távolságra a kereszteződéstől (4. ábra).



4. ábra. A csatorna egészen, és a négy metszeten kialakuló maximális nyírófeszültség ($u_{v0} = u_{p0} = 0,3$ m/s)

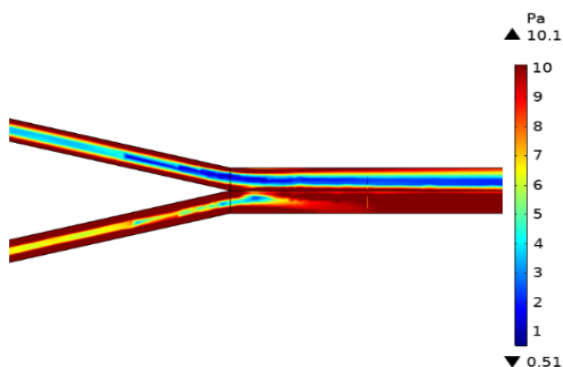
A metszeti vonalak mentén kapott értékek kisebb maximális nyírófeszültséget érnek el, mint az egész csatorna mentén kapott érték, ugyanis a vonalak elhelyezéséből adódóan sikerült kiküszöbölni a fal melletti magas nyírófeszültségek hatását. Az első és második metszeti profil esetén a két csatorna összefolyása miatt még nem alakult ki a végleges sebességprofil, ezért itt a nyírófeszültség-értékek magasabbak. A harmadik, és negyedik metszeti profil viszont már megfelelően jellemzi a folyadékok között fellépő nyírást. 0,3 m/s bemeneti sebességnél a két folyadék között fellépő legnagyobb nyírófeszültség a modell alapján 6 Pa körüli értékre esik. Az artériás érrendszerre jellemző nyírófeszültség 1-7 Pa között mozog [10], ami jól közelíti az általunk kapott eredményt.

Különböző, magasabb bemeneti sebességek mellett kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a sebesség növelése növeli a maximális nyírófeszültséget a csatorna egészében és a folyadékok között is. Ezen felül itt is megfigyelhető, hogy áramlási profil körülbelül a harmadik és negyedik keresztmetszetre stabilizálódik; az ott mérhető feszültség értékek jól jellemzik az összeömlés utáni csatornában fellépő áramlási körülményeket (5. ábra).

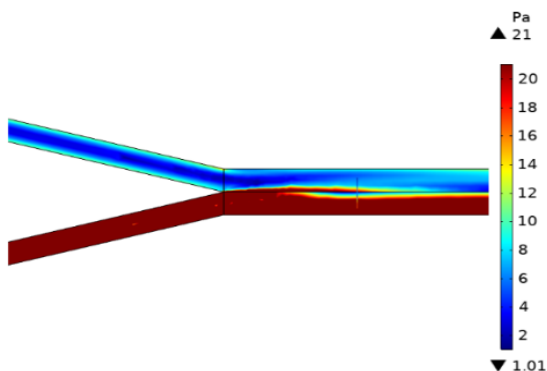


5. ábra. A metszeteken kapott maximális nyírófeszültség értékek különböző bemeneti sebesség mellett ($u_{v0} = u_{p0}$)

Eltérő bemeneti sebességek hatását a harmadik metszeten vizsgáltuk, hiszen az itt kapott eredmények már megfelelően jellemzik a kialakult áramlási profilt. A víz bemeneti sebességének növelése (0,3 m/s-ról 1 m/s-ra) 10,1 Pa nyírófeszültséget eredményezett (6. ábra). A vérplazma bemeneti sebességének növelésével (0,3 m/s-ról 1 m/s-ra) 21 Pa nyírófeszültség lépett fel (7. ábra).



6. ábra. A harmadik metszeten kapott nyírófeszültség eltérő bemeneti sebességek esetén ($u_{v0} = 1$ m/s; $u_{p0} = 0,3$ m/s)

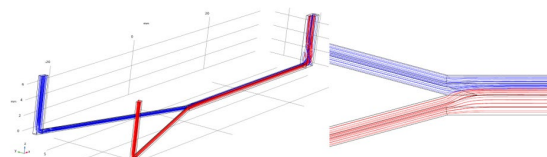


7. ábra. A harmadik metszeten kapott nyírófeszültség eltérő bemeneti sebességek esetén ($u_{v0} = 0,3$ m/s; $u_{p0} = 1$ m/s)

Amennyiben a két folyadék bemeneti sebessége között túlságosan nagy az eltérés, a nagyobb sebességgel folyó folyadék képes elnyomni, lelassítani a másikat.

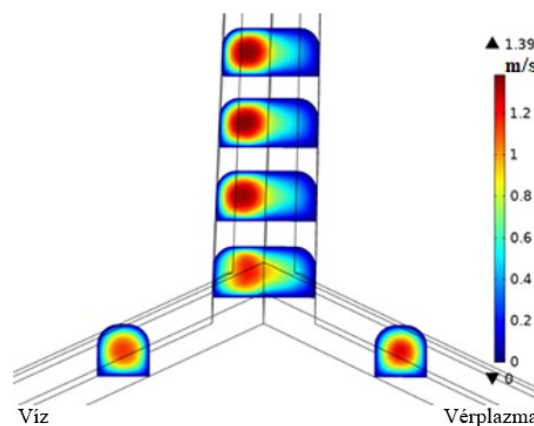
3.2. A háromdimenziós modell eredményei

A folyadékok áramlását a 8. ábra szemlélteti. A kétdimenziós modellhez hasonlóan itt is a víz oldalára tolódott az áramlás (8. ábra, jobb oldal). A kék szín a vizet, a piros a vérplazmát jelöli.



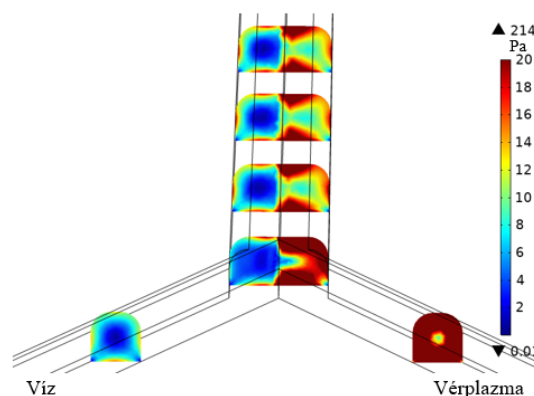
8. ábra. Áramvonalak a csatornában ($u_{v0} = u_{p0} = 0,3$ m/s; kék – víz, piros – vérplazma)

Az maximális áramlási sebesség (1,39 m/s) az összefolyás után a víz oldalán mérhető, hasonlóan a kétdimenziós szimuláció eredményéhez (9. ábra).



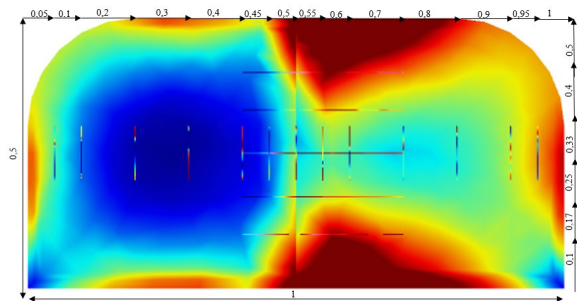
9. ábra. A csatornában kialakuló áramlási sebességprofil ($u_{v0} = u_{p0} = 0,3$ m/s)

A csatornában fellépő maximális nyírófeszültség 214 Pa, ami magasabb, mint a kétdimenziós modell esetén (10. ábra).



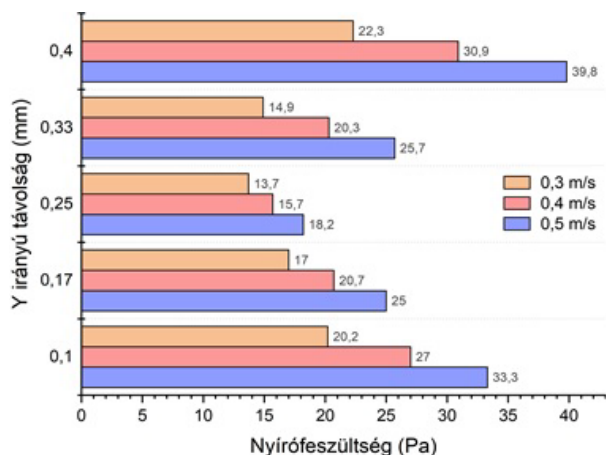
10. ábra. A csatornában kialakuló nyírófeszültség ($u_{v0} = u_{p0} = 0,3$ m/s)

A legmagasabb nyírófeszültséget a fal mellett mérhetjük, ez azonban nem szolgáltat információt a csatorna belsejében kialakuló nyírófeszültségről. A két folyadék között fellépő erők meghatározása 5 db horizontális és 13 db vertikális metszet segítségével történt (11. ábra).



11. ábra. A nyírófeszültség mérésére szolgáló vonalprofilok

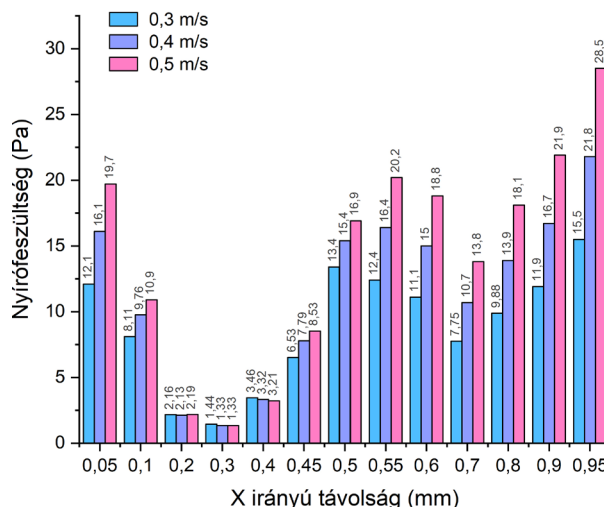
A metszetek vizsgálatát változó bemeneti sebességek ($u_{v0} = u_{p0} = 0,3; 0,4; 0,5$ m/s) mellett végeztük. A horizontális metszetekből kapott értékeken látható, hogy a csatorna falához közeli alsó és felső metszetekhez magasabb nyírófeszültség tartozik (20,2–39,8 Pa) amelyek nem jellemzik kellően a két folyadék határán fellépő nyírófeszültséget. A középső három metszeten megfigyelhető a folyadékok közötti nyírófeszültség (13,7 és 25,7 Pa között). Ez alapján kerültek megadásra a vertikális vonalprofilok (12. ábra).



12. ábra. A horizontális keresztmetszeti profilok maximális nyírófeszültsége

A vertikális keresztmetszeti profilokon is egyértelmű eltérés látható a csatorna fala mellett mért és a csatorna közepén lévő értékek között. A csatorna falához közel mindhárom sebességen nagyobb a nyírófeszültség, mint a csatorna közepénél. A két folyadék határa 0,3 m/s bemeneti sebességnél 0,5 mm-nél, míg a 0,4 és 0,5 m/s bemeneti sebességnél 0,55 mm-nél állapítható meg,

tehát a sebesség növelésével a feszültségérték maximuma a vérplazma oldalához tolódik. A három sebességre nézve 13,4; 16,4 és 20,2 Pa közötti maximális nyírófeszültség értékek jelentek meg a két folyadék fázis között (13. ábra).



13. ábra. A vertikális keresztmetszeti profilok maximális nyírófeszültsége (bal oldal víz; jobb oldal vérplazma)

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásunk során egy mikrofluidikai csatornában kialakuló áramlási körülményeket vizsgáltuk véges elemes folyadékdinamikai szimulációk segítségével. Fő célunk a csatornában lévő nyírófeszültség vizsgálata volt, ugyanis magas nyírófeszültség hatására aktiválódhat a vWF. Kétdimenziós és háromdimenziós modelleken egymással megegyező, és egymástól eltérő bemeneti sebességek nyírófeszültségre való hatását vizsgáltuk. Megállapítható, hogy a bemeneti áramlási sebesség növelése a nyírófeszültség-értékek megemelkedéséhez vezet. A kétdimenziós modell esetén az artériás érrendszere jellemző értékeket kaptuk szimulációink során, a háromdimenziós szimulációk magasabb nyírófeszültséget mutattak. Ahhoz, hogy pontosabb képet kapjunk a nyírófeszültség vWF-re való hatásáról további szimulációkra, és az Elektronikai Technológia Tanszék gyorsprototípezési kompetenciáival [11,12] létrehozott mikrofluidikai rendszerekkel elvégzett kísérletekre van szükség.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A cikkben megvalósult kutatás-fejlesztést a Nemzeti Kutatás-Fejlesztési és Innovációs Hivatal támogatta az alábbi pályázatokon keresztül: TKP2021-EGA-02, OTKA-K19_131945 (IB).

Borók Alexandra hálás a Kooperatív Doktori Program (KDP, Innovációs és Technológia Minisztérium, ITM) támogatásáért.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Nichols William. L., Hultin Michael B., James Andra Hohler, Manco-Johnson Marilyn J., Montgomery Robert R., Ortel Thomas Lee, Rick Margaret E., Sadler J. Evan., Weinstein Miriam, Yawn Barbara P. „von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines” the National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia*; Vol. 14, pp. 171-232, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2007.01643.x.
- [2] John Schrader, Monica White, Peter Silberstein, Yusuke Shiozawa „Hemophilia” *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2015. DOI:10.1016/b978-0-12-801238-3.05056-x
- [3] K. Pavani Bharati; U. Ram Prashanth, „Von Willebrand Disease: An overview” *Indian J Pharm Sci*. Vol. 73, No. 1, pp. 7–16, 2011. DOI: 10.4103/0250-474X.89751
- [4] Sadler J. Evan, Budde Ulrich, Eikenboom Jeroen C. J., Favoloro Emmanuel J., Hill F. G. H., Holmberg L., Ingerslev Jorgen, Lee C. A., Lillicrap David, Mannucci Mannuccio, Mazurier C., Meyer D., Nichols W. L., Nishino M., Peake I. R., Rogehiero Francesco, Schneppenheim R., Ruggeri Z. M., Srivastava Alok, Montgomery R. R., Federici A. B., Working Party Von W. „Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor”. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Vol. 4, pp. 2103-2114, 2006. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x.
- [5] Gnanamanickam, Ebenezer P., Nottebrock, Bernardo, Große, S., Sullivan, John P, Schröder, Wolfgang „Measurement of turbulent wall shear-stress using micro-pillars” *Meas. Sci. Technol*. Vol. 24, pp. 124002, 2013. DOI: 10.1088/0957-0233/24/12/124002
- [6] Bednarz, Tomasz, Domanski, Luke and Taylor, John A „Computational Fluid Dynamics using OpenCL – a practical introduction”. *ICMS*, Australia, 12-16.December, 2011. DOI:10.36334/modsim.2011.a8.bednarz
- [7] Ravi S. Johar, Roger P. Smith “Assessing gravimetric estimation of intraoperative blood loss,” *Journal of Gynecologic Surgery*, Vol. 9, No. 3, pp. 151–154, 1993. DOI: 10.1089/gyn.1993.9.151.
- [8] Miguel A. Quetzeri-Santiago, Clara L Hedegaard, J. Rafael Castrejón-Pita „Additive Manufacturing with liquid latex and recycled end-of-life rubber” *3D Printing and Additive Manufacturing*, Vol. 6, No. 3, pp. 149-157, 2019. DOI: 10.1089/3dp.2018.0062
- [9] Couzon, Cécile, Duperray, Alain & Verdier, Claude „Critical stresses for cancer cell detachment in microchannels” *Eur Biophys J*, Vol. 38, pp. 1035–1047. 2009. DOI: 10.1007/s00249-009-0506-1.
- [10] Malek Adel M., Alper Seth L., Izumo Selgo „Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis” *JAMA*, Vol. 282, No.21, pp. 2035–2042, 1999. DOI: 10.1001/jama.282.21.2035.
- [11] Attila Bonyár, Hunor Sántha, Balázs Ring, Máté Varga, József Gábor Kovács, Gábor Harsányi ”3D Rapid Prototyping Technology (RPT) as a powerful tool in microfluidic development” *Procedia Engineering* Vol. 5, pp. 291-294, 2010 DOI: 10.1016/j.proeng.2010.09.105
- [12] Attila Bonyár, Hunor Sántha, Máté Varga, Balázs Ring, Gábor Harsányi, “Characterization of PDMS micromolding utilizing molding forms fabricated by 3D Rapid Prototyping Technology (RPT)”, *Int. Journal of Material Forming* Vol. 7, No. 2, pp. 189-196, 2014 DOI: 10.1007/S12289-012-1119-2