

MIKROFLUIDIKAI RÉSZECSCKE ELVÁLASZTÁSI
TECHNIKÁK ORVOSBIOLÓGIAI
FELHASZNÁLÁSRA



Laki András József

Ph.D. disszertáció tézisei

Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Információs Technológiai és Bionikai Kar

TÉMAVEZETŐ:
Iván Kristóf, Ph.D.
Civera Pierluigi, Ph.D. †
Demarchi Danilo, Ph.D.

Budapest, 2015

1. Bevezetés

A mikrofluidika tudományterülete magába foglalja a csatornák tervezését, gyártását és használatát. Az utolsó két évtizedben a mikrofluidikai eszközök fejlesztése egyre jobban előtérbe kerültek [1]. A mikrofluidikai eszközök tervezése során nemcsak az áralástannal, és a megmunkálási folyamatokkal kell tisztában lenni, hanem alaposan meg kell ismerkedni az adott biológiai/kémiai/analitikai/ipari feladattal is, amihez az adott eszközt tervezzük. Egy interdiszciplináris tudományterületről lévén szó a mikrofluidikai eszközök használatának számtalan felhasználási lehetőségét találhatunk az orvosi diagnosztikában, a kémiai analitikában, és a laboratóriumi műveletsorok automatizálása területén [2]. A mikrofluidikai eszközök egyik leggyakrabban kutatott területe a „Laboratórium-egy-chipen” (lab-on-a-chip, LOC) eszközök fejlesztése. A LOC mikrofluidikai eszközökkel szembeni alapvető elvárás, hogy megvalósításuk során törekedjünk a laboratóriumtól való függetlenítésre, a biokompatibilitásra, az olcsóságra, a hatékonyságra és a gyorsaságra. Mint ahogy egy komplex laboratóriumban, egy LOC eszköznek magába kell foglalnia a folyadékminták mozgatását, a mintaelőkészítést, és a minták vizsgálatát/kiértékelését is [3, 4]. A mikrofluidikai eszközben történő mintaelőkészítés kiemelt fontosságú. A LOC eszközökkel forradalmasíthatóak a klasszikus mintaelőkészítési technikák, ami történhet gyorsaságban, pontosságban és műveleti idő tekintetében is [5].

A biológiai folyadékokból gyakran kell sejteket, sejtés elemeket, extracelluláris részecskéket elválasztani. A mikrofluidikai eszközökkel történő sejtszeparáció jelentős szakirodalommal rendelkezik már [6, 7]. A részecskék elválasztása során figyelembe kell venni a vizsgált biológiai mintafolyadék adottságait, melyek nagyban függenek a minta összetételétől. Általánosságban a részecskéket/sejteket valamilyen tulajdonságuk alapján különböztetjük meg és választjuk el őket egymástól [8].

A mintaelőkészítési metódusok mikrofluidikai eszközökbe történő megvalósítása jelentős előnyökkel rendelkezik [9]. A mikrofluidikai részecskeszeparáció történhet az áramlással megegyező vagy rá merőleges elválasztási erők hatására. A folyadékminta adagolása tekintetében lehet kvantált vagy folyamatos. A kvantált minták esetében általában az áramlási iránnyal megegyező erők használatával időben történik a részecskék szétválasztása. A mikrofluidikában viszont olyan elválasztási technikák is kivitelezhetőek, ahol egy folyamatos mintafolyadékból az áramlási irányra merőleges erőtér hatására pozíció szerint választjuk szét a különböző részecskéket.

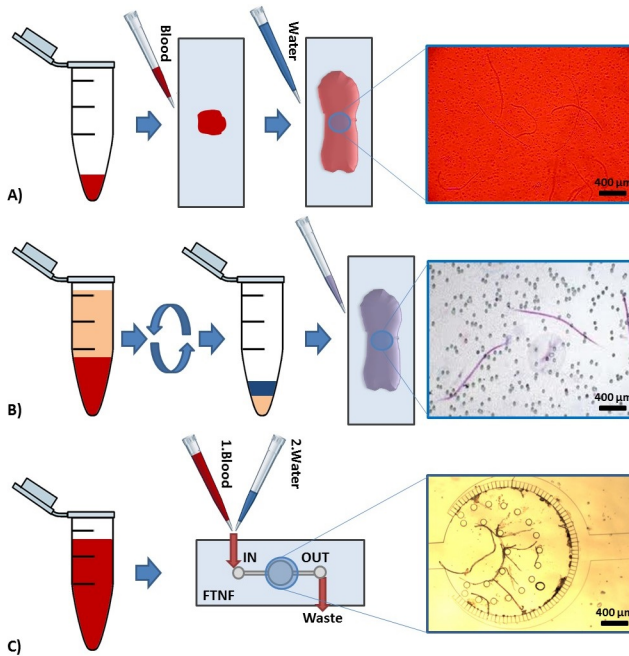
2. Vérben élő patogének szűrése

A vérben élő patogének szűrése terén azt a célt tűztem ki, hogy hatékonyabb és gyorsabb kimutatási eljárást/eszközt valósítsak meg, mint a már létező, leggyakrabban használt állatorvosi módszerek. A legelterjedtebb állatorvosi módszerek három osztályba csoportosítják a nematódákkal fertőzött mintákat fertőzöttség szerint (-, +, és ++). Az előnyük, hogy egyszerűek és olcsók, viszont nem kvantitatívak. Több milliliternyi vérmintában nem képes megbízható számot adni a patogének populációjáról. Az új mikrofluidikai eszközöm segítségével hatékonyan megszámlálható a vérben lévő nematódák populációja akár több milliliternyi mintában is. A vizsgálati módszerem segítségével akár valós időben is elvégezhető a patogének összeszámolása.

A legelterjedtebb kimutatási eljárás a vérkenet módszer, ami 1.a. ábrán látható. A módszer során egy tárgylemez felületére pipettázuk a vizsgált vérmintából, majd a mintát ioncserélt víz hozzáadásával hemolizáljuk. A másik legelterjedtebb módszer a módosított Knott módszer, ami 1.b. ábrán látható. Az alvadásban gátolt vérmintát 2%-os formalin oldattal centrifugacsőben összekeverjük. 5 perc 1500 rpm centrifugálás után a szedimentumot metilénkék festékkel fajspecifikusan színezzük a nematódák kutikuláját. A nematódák számát optikai úton határozzuk meg.

Egy mikrofluidikai parazita szűrőt terveztem (flow-through nematode filter, FTNF), mely 1.c. ábrán látható. A mikrofluidikai eszközünk segítségével alacsony fertőzöttségű mintából is kimutathatóak a fertőzések. A vérmintát keresztül áramoltatjuk a mikrofluidikai eszközön, majd a szűrőn fennakadt nematódákat összeszámoljuk a hemolizálás után.

A mikrofluidikai eszközünk kapilláris széleségét a nematóda lárvák nagyságához méreteztük. A nematódák eleventojók és az ebrióit (mikrofilária) a véráramba juttatja, melynek hossza 330 – 380 μm és szélessége 5 – 7 μm [10]. A bemutatott mikrofluidikai eszköz ezen mikrofiláriák szűréseire terveztük, de hasonló klinikai és állatorvosi diagnosztikában is használható.

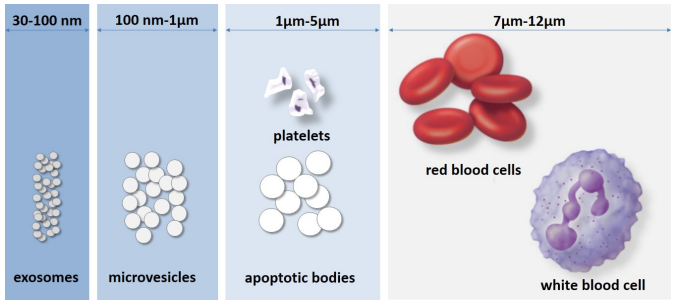


1. ábra. A leggyakrabban használt kimutatási eljárások összehasonlítása. A) Vérlenet módszer. A tárgylemezre pipetázunk az alvadásban gátolt vérmintából, majd ioncserélt víz hozzáadásával hemolizáljuk a vérmintát. Végezetül optikai úton összeszámoljuk a nematódák számát. B) Módosított Knott módszer. Az alvadásban gátolt vérmintát 2%-os formalin oldattal centrifugacsőben összekeverjük. 5 perc 1500 *rpm* centrifugálás után a szedimentumot metilénkék festékkel fajspecifikusan színezzük. Végezetül optikai úton összeszámoljuk a nematódák számát. C) Keresztül áramlásos paratiza szűrő. A saját fejlesztésű mikrofluidikai eszköz segítségével a nematódák kiszűrhetők több milliliternyi mintából, majd hemolízis után a paraziták száma optikai úton összeszámolható.

3. Tumor sejtek által szegregált extracelluláris vezikulák jelölésmentes elválasztása szerológiai mintákból

A sejtek extracelluláris vezikulák segítségével képesek kapcsolatba lépni más sejtekkel, ami nagyon fontos szereppel bír a rákkutatás és más

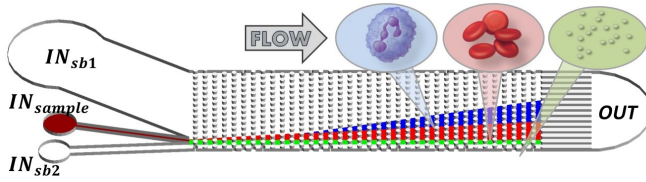
patológiás kimutatásnál. A vér alakos sejteneinek és az extracelluláris vezikulák méretskálája a 2. ábrán látható. A mikrovezikulák szeparációja jelenleg 6-7 órás centrifugálási procedúrával történik. A tumor sejtek által szegregált extracelluláris vezikulák elválasztása területén főbb célkitűzéseim között szerepelt, hogy jelölésmentesen, folyamatos áramlás mellett válasszak el mikron alatti részecskéket vérmintákból. Ennek megoldására egy olyan mikrofluidikai szeparációs eljárást választottam, ami külső erőter nélkül képes ezt megoldani.



2. ábra. A vér sejtjes elemeinek és az extracelluláris részecskének a mérete. Az exoszómák mérete megegyezik a vírusokéval, a mikrovezikulák a baktériumokéval azonos, az apoptotikus részecskék és a vérlemezkék mérete 1 – 5 μm tartományba esik. A vörösvértestek 6 – 8 μm nagyságúak, míg a fehérvérsejtek 7 – 12 μm .

A szakirodalmazáson alapulva egy új mikrofluidikai eszközt terveztem, hogy elválasszak tumor sejtek által szegregált extracelluláris vezikulákat szerológiai mintákból. A mikrofluidikai eszközöm újdonsága, hogy egy folyamatos, jelölésmentes módon választom el ezeket a mikrovezikulákat egy asszimmetrikus oszlopstruktúra segítségével. A felhasznált metódust elsőként Huang publikálta le [11], amit determinisztikus oldalirányú eltolódás (deterministic lateral displacement, DLD) elvének nevezett. A DLD technika egy méret alapú részecske szétválasztási procedúra, ami a részecskék jelentős térbeli szétválasztásával és széleskörű részecskeméretre illesztetőséggel jellemezhető. A tervezett eszközöm három bemenettel, egy kimenettel és egy pár milliméter hosszú ezzel a speciális asszimmetrikus oszlopstruktúrával kitöltött résszel rendelkezik.

A DLD eszközre egy részecske szeparációs és manipulációs elvként tekinthetünk. Mérésekkel igazoltuk, hogy a DLD eszköz sikeresen alkalmazható mikrovezikulák jelölésmentes elválasztásához. Az eredmé-



3. ábra. A determinisztikus oldalirányú eltolódás (deterministic lateral displacement, DLD) alapú eszköz rajza. A serológiai mintát (IN_{sample}) az oldalsó puffer oldatok (IN_{SB1} és IN_{SB2}) segítségével összefókuszáljuk. A különböző méretű részecskék (fehérvérsejt (kék), vörösvértest (piros), és a mikrovezikulák (zöld)) szétválnak az oszlopstruktúrán való áthaladásuk során.

nyekből kiindulva a DLD eszközünk alkalmazható a vér sejtjes elemeinek vizsgálatához is. A DLD eszközünk segítségével a sejtek egymás közötti kommunikációja is vizsgálható.

4. Alkalmazott módszerek

Az alábbi alkalmazott módszereket használtam fel:

Két mikrofluidikai elválasztási módszert valósítottam meg orvosi biológiai feladatok elvégzése érdekében. Egy keresztül áramlásos eszközt valósítottam vérben élő parazita lárvák kiszűréséhez. Míg egy folyamatos, jelölésmentes részecske szeparációs módszert alkalmaztam mikron alatti részecskék biológiai folyadékokból való kiszűréséhez, melyet determinisztikus oldalirányú eltolódás (deterministic lateral displacement, DLD) elvének hívunk.

Ahhoz, hogy a mikrofluidikai eszközeim geometriáit megtervezzem és optimalizáljam áramlástanai számolásokon alapuló (computational fluid dynamics, CFD) szimulációkat végeztem el. A mikrofluidikai eszközeim gyártása előtt kiszámoltam az adott struktúrák áramlási sebesség és nyomás profiljait COMSOL Multiphysics program segítségével.

A csatornák tervezéséhez AutoCAD tervezőszoftvert használtam. 12 különböző mikropillár méretű patogén szűrőt és egy multimodális oszlopstruktúrát terveztem. A mikrofluidikai eszközeimet polimerek felhasználásával valósítottam meg [12, 13]. A megtervezett csatornaformákat szilícium szeletre világítottam le fényérzékenylakk (SU-8) segítségével, majd a kialakított öntőformát polidimetilsziloxánnal borítottam. A csatornákat tartalmazó polimerizálódott réteget plazmázás segítségével tárgylemezekhez rögzítettem, megalkotva ezáltal mikrofluidikai csatornáimat.

A kísérleteimhez összeállítottam egy mérőkörnyezetet, majd mérési procedúrákat alkottam, hogy tesztelni tudjam velük eszközeimet. A mikrofluidikai eszközeimben folyamatos áramlást alakítottam ki fecskendőpumpák segítségével. Felvételeket készítettem minden mérésről egy inverz mikroszkóphoz illesztett kamerarendszer segítségével, mely segítségével összeszámoltam a részecskéket.

5. Új tudományos eredmények

I. Tézis csoport: Egy új, izobár szűrővel rendelkező, keresztül áramlásos szűrőt terveztem meg, fejlesztettem ki és mértem meg vérben élő patogének elválasztásához, kimutatásához és alalízisükhöz.

A tézishoz kapcsolódó publikációk: [L1, L4-L10]

I.1: Egy új mikrokapilláris struktúrát terveztem meg és alakítottam ki biokompatibilis anyagokból, mely segítségével mikron nagyságú patogének mutatóak ki.

a) Egy új mikrokapilláris struktúrát terveztem (flow-through nematode filter, FTNF) vérben élő mikron nagyságú patogének szűrésére. A mikrofluidika szűrő egy izobár köralakó egységből áll, amit egy mikrokapilláris struktúra vesz körbe. A kapilláris csatornák $6.1 \mu\text{m}$ és $15.4 \mu\text{m}$ közti keresztmetszetűek, melyek segítségével széleskörű nyomás és áramlási feltételeket tesztelhetünk.

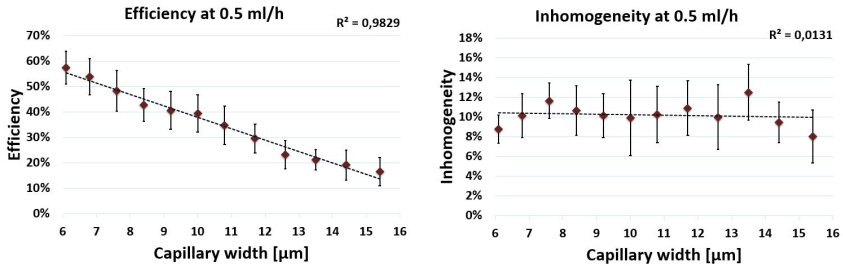
b) Meghatároztam az áramlási sebesség és nyomás profiljaikat mindegyes FTNF szűrőnek. Különböző áramlási sebességen áramlástanival véges elem szimulációkon alapuló számolást végeztem. Kiszámoltam az eszközökön fellépő nyomásesést és az áramlási ellenállást minden egyes eszközön, hogy egy izobár központi részt alakítsak ki, illetve hogy a mérések során elkerüljem a túlnyomásból eredő szivárgásokat. A szimulációs eredményekből kiderül, hogy a várható nyomásesés 1 bár alatt marad, ami garantálja a szivárgásmentességet. Megvizsgáltam, hogy a mikrofluidikai eszköz 50% -os eltömődése során sem közelíti meg a nyomásesést ezt a kritikus határt.

I.2: Demonstráltam a nematoda szűrő működési elvét, definiáltam és megmértem a mikrofluidikai szűrés hatékonyságát és a minta inhomogenitását.

a) Különböző mikrokapilláris szélességű FTNF struktúrákat gyártottam le polimerek megmunkálásával. Az FTNF eszközök teszteléséhez egy mérési környezetet, és egy 4 lépésből álló mérési procedúrát állítottam össze.

b) Meghatároztam a FTNF eszköz szűrés hatékonyságát és a vérminta inhomogenitását, mivel a mérések során a vérminták szedimentálódása jelentős mértékben történt. A mikrofluidika eszköz szűrés hatékonyságának a meghatározása szükséges volt, mivel nem 100% -os hatékonyságú.

sággal szűri ki a nematódákat. A FTNF eszköz geometriai paramétereit a nemtódákhoz méreteztem, hogy egy átlagos szűrési hatékonyságot tudak meghatározni. A nehezebb részecskék (nematódák) ülepedése alacsonyabb áramlási sebességnél jelentős, ami rontja a szűrési hatékonyság összehasonlíthatóságát.



4. ábra. A 6.1 μm és 15.4 μm közötti mikrokapillárisok szűrési hatékonyságának a vizsgálata 0.5 ml/h áramlási sebességen, és a hozzájuk tartozó minta inhomogenitás vizsgálat eredményei. A hibasávok a standard eltérést mutatja az átlagértékektől.

A mikrofluidikai eszközök nematódákkal fertőzött vérmintákkal való tesztelése során megmértem mindegyik FTNF eszköz szűrési hatékonyságát különböző áramlási sebességeken (0.25 ml/h , 0.5 ml/h és 1 ml/h). A mérések során a vérminták inhomogenitását is mértem, hogy a szűrési hatékonyságok eredményei összehasonlíthatóak legyenek. Azt tapasztaltam, hogy a legjobb szűrési hatékonyságot a 6.1 μm kapilláris szélességű FTNF eszköznél mértem 0.5 ml/h áramlási sebességen, amit a 4. ábra is mutat.

Kimutattam a folyadék áramlási sebességének hatását a vérminta inhomogenitására. Kimutattam, hogy a növelve az áramlási sebességet a minta inhomogenitása csökken.

A kapilláris keresztmetszet ($W_{\text{capillary}}$) csökkentésével a nematódák szűrési hatékonysága növelhető, de magasabb áramlási sebesség esetén a nematódák kimoshatóak a mikrofluidikai szűrőből a megnövekedett nyomásesés következtében.

II. Tézis csoport: A tumor sejtek által szegregált extracelluláris vezikulák folyamatos, jelölésmentes elválasztását valósítottam meg serológias mintákból a determinisztikus oldalirányú eltolódás (deterministic lateral displacement, DLD) elv használatával. A DLD elv új kutatási területen való alkalmazásához terveztem meg, gyártottam le és teszteltem mikrofluidikai eszközeimet. Megmértem a mikrofluidikai eszköz elválasztási hatékonyságát. Az elméleti háttér jobb megértése és a mérések tapasztalatainak a kiértékelése során egy új modellt alkottam a DLD eszközben történő részecskék szétválasztására.

A tézishoz kapcsolódó publikációk: [L2, L10-L15]

II.1: Egy multimodális determinisztikus oldalirányú eltolódás (deterministic lateral displacement, DLD) oszlopstruktúrát alakítottam ki tumor sejtek által szegregált extracelluláris vezikulák folyamatos, jelölésmentes elválasztására.

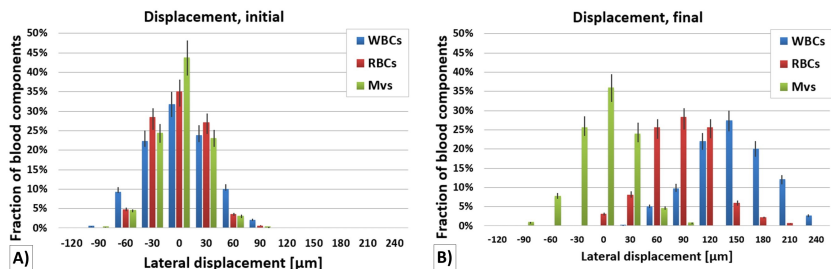
a) Egymás utáni aszimmetrikus oszlopstruktúrákat terveztem henger formájú oszlopokkal, mely segítségével egy multimodális DLD struktúrát alakítottam ki. Kiszámoltam az egymás utáni oszlopstruktúrák kritikus keresztmetszetét. Mindegyik DLD oszlopstruktúrában a henger formájú oszlopok átmérője (D_{post}) $20 \mu m$, az oszlopok közötti rés (g) $10 \mu m$, a horizontális oszlop periódus (λ) $30 \mu m$, míg a vertikális oszlop periódus (γ) $40 \mu m$. Az oszlopsorok közötti vertikális eltolódás faktor (ϵ_n) 0.1 és 0.33 közötti tartományt karol fel $1/60$ -es léptékkal, melyek meghatároznak minden struktúrában egy kritikus keresztmetszetet ($D_{c,n}$), ami $3.9 \mu m$ és $7.7 \mu m$ között van (Fig. ??).

b) Kiszámítottam a nyomásesést és az áramlási ellenállást különböző magasságú eszközökön, hogy meghatározzam a csatorna magasságát és a DLD struktúra hosszát.

c) "Softlitográfia" segítségével DLD eszközöket készítettem. Egy mikrofluidikai keretrendszert és egy mérési procedúrát alkottam a készített DD eszközök teszteléséhez.

d) Egy félautomatizált mérési környezetet alakítottam ki valós idejű képfeldolgozási algoritlussal, hogy a részecskék összeszámolását egy CNN-alapú algoritmus segítségével elvégezzem a DLD csatornák kivezeti részében. Ezzel az algoritlussal számoltam össze a sejtek számát egy v1.3as EyeRIS kamera segítségével.

II.2: Gyakorlati úton bebizonyítottam, és megmértem a fehérvérsejtek, a vörösvértestek és a mikrovezikulák DLD struktúra általi elterülését. A kísérleti mérések tapasztalataiból kiindulva a DLD eszközben történő részecskék mozgására egy újabb modellt alkottam.



5. ábra. A vér főbb komponenseinek (fehérvérsejtek, vörösvértestek, és mikrovezikulák) szeparációja a kialakított DLD struktúra segítségével. A) A fehérvérsejtek, a vörösvértestek, és a mikrovezikulák eloszlása a bemeneti részen. B) Ugyanazon részecskék eloszlása a DLD kimeneti részen.

a) Gyakorlati úton bebizonyítottam, hogy a tumor sejtek által szegregált extracelluláris vezikulák elválaszthatóak egy saját fejlesztésű DLD eszköz segítségével 1 mm/s áramlási sebességen $20 \mu\text{m}$ magas csatornában az alábbi paraméterekkel: $g = 10 \mu\text{m}$, $\lambda = 30 \mu\text{m}$, $\Delta\lambda$ 3 és $10 \mu\text{m}$ között $0.5 \mu\text{m}$ -os lépésközzel. A fehérvérsejtek, a vörösvértestek, és a mikrovezikulák eredeti pozíciójuktól való eltolódását lemértem a DLD csatorna végső szakaszában (Fig. 5).

b) A DLD eszközben történő részecskék mozgására egy új modellt alkottam, ami figyelembe veszi a részecskék fizikai tulajdonságait is (tömeg, átmérő és sebesség).

6. Eredmények alkalmazási területei

Egy keresztül áramlásos nematóda szűrőt (flow-through nematode filter, FTNF) fejlesztettem, hogy kiszűrjem a keringő nematódák lárváit a vérmintából. Egy determinisztikus oldalirányú eltolódáson (deterministic lateral displacement, DLD) alapuló eszközt valósítottam meg, hogy extracelluláris vezikulákat válasszak el serológiai mintákból.

A mikrofluidikai eszközeim diagnosztikai készülékként alkalmazhatóak számos más orvosbiológiai célra is, mint például mintaelőkészítéshez, kémiai analitikához, vagy más ipari részecske elválasztáshoz. Mikrofluidikai eszközeim geometriai módosításával könnyen átalakíthatóak más adott feladat elvégzésére.

Az orvosbiológiai értelemben, ezek a mikrofluidikai eszközök vércép változásának a vizsgálatára és a véralkotó sejtek állapotának monitorozására is kiválóak lehetnek. A DLD eszközök alkalmazhatóak továbbá sejtek alaktani változásának vizsgálatához, fertőzések (pl.: sarlós vérszegénység, malária, vérben lévő egyéb mikronos nagyságú patogének) kimutatására is.

A DLD eszközök egy másik főbb felhasználási területe a keringő tumor sejtek (circulating tumor cells, CTCs) vizsgálata, illetve ezen tumor sejtek osztályozása, ami valószínűleg a rákos áttét kisugárzásának fő okozója. Mind a két eszköz használható a vér folyamatos monitorozásához, mely segítségével több információval rendelkezhetünk az orvosbiológiai folyamatok megértéséhez.

Egy másik fontos felhasználási területe lehet mikrofluidikai eszközeimnek: az ivóvíz vizsgálata. Az ivóvíz nélkülözhetetlen az élethez, világ lakosságának jelentős hányada nem jut tiszta és egészséges ivóvízhez. A vízben élő fertőzések általi halálesetek száma növekvő tendenciát mutat, így az vízkészletünk megtisztítása egy nagyon frekvenciát kutatási terület lett. Az általunk tervezett eszközök segítségével képesek vagyunk vízben élő mikron méretű fertőzések kimutatására is.

Ezek alapján megállapítható, hogy ezen mikrofluidikai eszközöknek számos felhasználási módja lehet a közeljövőben.

7. A szerző publikációi

[1] **A. J. Laki**, K. Ivan, E. Fok, and P. Civera, “*Filtration of Nematodes using an Integrated Microcapillary System*,” *BioNanoSci.*, pp. 1–11, Oct. 2014.

[2] **A. J. Laki**, L. Botzheim, K. Ivan, V. Tamasi, and P. Civera, “*Separation of Microvesicles from Serological Samples Using Deterministic Lateral Displacement Effect*,” *BioNanoSci.*, pp. 1–7, Nov. 2014.

[3] I. N. Huszar, Z. Martonfalvi, **A. J. Laki**, K. Ivan, and M. Kellermayer, “*Exclusion-Zone Dynamics Explored with Microfluidics and Optical Tweezers*,” *Entropy*, vol. 16, no. 8, pp. 4322–4337, Aug. 2014.

[4] **A. J. Laki**, G. Z. Nagy, K. Ivan, P. Furjes, O. Jacso, E. Fok, and P. Civera, “*Integrated microcapillary system for microfluidic parasite analysis*,” in 2013 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS), 2013, pp. 118–121.

[5] **A. J. Laki**, K. Ivan, Z. Fekete, D. Demarchi, and P. Civera, “*Filtration of intravenous cardiopulmonary parasitic nematodes using a cross-flow microfluidic separator*,” presented at the NanoBio-Europe (NBE), 2012.

[6] **A. J. Laki**, K. Ivan, Z. Fekete, P. Furjes, and P. Civera, “*Filtration of intravenous cardiopulmonary parasitic nematodes using a cross-flow microfluidic separator*,” presented at the EMBL Microfluidics, 2012.

[7] **A. J. Laki**, K. Ivan, P. Furjes, and P. Civera, “*Integrated microcapillary system for microfluidic parasite analysis*,” presented at the Advances in Microfluidics & Nanofluidics (AMN), 2013.

[8] **A. J. Laki**, G. Z. Nagy, K. Ivan, P. Furjes, and P. Civera, “*Stand-alone integrated microfluidic parasite analysis system*,” presented at the From Medicine to Bionics, 2013.

[9] **A. J. Laki**, G. Nagy, K. Ivan, P. Furjes, and P. Civera, “*Stand-alone integrated microfluidic parasite analysis system*,” presented at the NanoBioEurope (NBE), 2013.

[10] **A. J. Laki**, G. Nagy, K. Ivan, P. Furjes, and P. Civera, “*Stand-alone integrated microfluidic parasite analysis system*,” presented at the International Conference on Biomedical Engineering (ICBME), 2013.

[11] **A. J. Laki**, L. Botzheim, K. Ivan, T. G. Szabo, V. Tamasi, E. Buzas, and P. Civera, “*Microvesicle Fractionation Using Deterministic Lateral Displacement Effect*,” presented at the IEEE Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS), 2014.

[12] **A. J. Laki**, L. Botzheim, K. Ivan, T. Szabo, E. I. Buzas, and P. Civera, “*Label-Free Fractionation of Tumor-Derived Extracellular Vesicles*,” presented at the IEEE Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS), 2014.

les from Human Blood Using Deterministic Lateral Displacement Effect,” presented at the Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014), 2014.

[13] **A. J. Laki**, I. Rattalino, A. Sanginario, N. Piacentini, K. Ivan, D. Lapadatu, J. Taylor, D. Demarchi, and P. Civera, “*An integrated and mixed technology LOC hydrodynamic focuser for cell counting application,*” presented at the IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS), 2010, pp. 74–77.

[14] **A. J. Laki**, I. Rattalino, F. Corinto, K. Ivan, D. Demarchi, and P. Civera, “*An integrated LOC hydrodynamic focuser with a CNN-based camera system for cell counting application,*” presented at the IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS), 2011, pp. 301–304.

[15] **A. J. Laki**, A. Sanginario, D. Demarchi, K. Ivan, and P. Civera, “*An Integrated and Mixed Technology LOC Hydrodynamic Focuser for Cell Counting Structures,*” presented at the NanoBio-Europe (NBE), 2011.

Hivatkozások

- [1] George M. Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101):368–373, July 2006.
- [2] Stefan Haeberle and Roland Zengerle. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab on a Chip*, 7(9):1094–1110, August 2007.
- [3] Darwin R. Reyes, Dimitri Iossifidis, Pierre-Alain Auroux, and Andreas Manz. Micro total analysis systems. 1. introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry*, 74(12):2623–2636, June 2002.
- [4] Pierre-Alain Auroux, Dimitri Iossifidis, Darwin R. Reyes, and Andreas Manz. Micro total analysis systems. 2. analytical standard operations and applications. *Analytical Chemistry*, 74(12):2637–2652, June 2002.
- [5] Todd M. Squires and Stephen R. Quake. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics*, 77(3):977–1026, October 2005.
- [6] Sherrif F. Ibrahim and Ger van den Engh. Flow cytometry and cell sorting. In Ashok Kumar, Igor Yu Galaev, and Bo Mattiasson, edi-

- tors, *Cell Separation*, number 106 in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, pages 19–39. Springer Berlin Heidelberg, January 2007.
- [7] Maria B. Dainiak, Ashok Kumar, Igor Yu Galaev, and Bo Mattiasson. Methods in cell separations. In Ashok Kumar, Igor Yu Galaev, and Bo Mattiasson, editors, *Cell Separation*, number 106 in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, pages 1–18. Springer Berlin Heidelberg, January 2007.
- [8] X.-J. J. Li and Y. Zhou. *Microfluidic Devices for Biomedical Applications*. Elsevier, October 2013.
- [9] Nicole Pamme. Continuous flow separations in microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 7(12):1644–1659, November 2007.
- [10] M. T. Manfredi, A. di Cerbo, and M. Genchi. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. *Mappe Parassitologiche*, 8:39–45, 2007.
- [11] Lotien Richard Huang, Edward C. Cox, Robert H. Austin, and James C. Sturm. Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science*, 304(5673):987–990, May 2004.
- [12] David C. Duffy, J. Cooper McDonald, Olivier J. A. Schueller, and George M. Whitesides. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, 70(23):4974–4984, December 1998.
- [13] J. Cooper McDonald and George M. Whitesides. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of Chemical Research*, 35(7):491–499, July 2002.