



جداسازی اسپرم‌های سالم از ناسالم با ترکیب دو پدیده‌ی دی‌الکتروفورز و تیگموتاکیسی علیرضا خوزستانی^۱، محمدحسین نصر اصفهانی^۲، یوسف حجت^{۳*}، مرضیه تولائی^۴، حسام صادقیان^۵

۱- دانشجوی دکتری، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، پژوهشکده زیست‌فناوری رویان، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران

۳- استاد، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دانشیار، پژوهشکده زیست‌فناوری رویان، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران

۵- دکتری، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول: Yhojjat@modares.ac.ir

چکیده

اطلاعات مقاله

مقاله پژوهشی

دریافت: ۸ آبان ۱۴۰۲
پذیرش: ۹ اسفند ۱۴۰۲

کلیدواژه‌ها:

اسپرم
میکروفلوئیدیک
دی‌الکتروفورز
جداسازی
تیگموتاکیسی

جداسازی اسپرم‌های سالم (متحرک و با بهترین ساختار DNA) به‌طور سنتی با روش‌های سانتریفیوژ شیب چگالی و یا شنا کردن به سمت بالا انجام می‌شود. در سال‌های اخیر، روش‌های مبتنی بر میکرو سیال توسعه پیدا کرده و پیش‌بینی می‌شود که در آینده‌ای نه‌چندان دور جایگزین روش‌های سنتی شود. سیستم‌های میکرو سیال نیاز به حجم نمونه کمتری داشته، که ضمن خلوص بالاتر، دارای مزایایی از قبیل کاهش هزینه و کاهش زمان آزمایش است. در این تحقیق از ترکیب پدیده‌ی تیگموتاکیسی که در آن اسپرم‌ها دیواره را دنبال می‌کنند با پدیده‌ی دی‌الکتروفورز مثبت که از میدان الکتریکی غیریکنواخت برای به دام انداختن ذرات استفاده می‌کند، یک عملگر میکروفلوئیدیک برای جدا کردن اسپرم‌های با تحرک بالا از اسپرم‌های با تحرک کمتر ارائه گردید. در این عملگر تعداد زیادی میکروکانال موازی تعبیه‌شده و اسپرم‌هایی که تحرک دارند، دیواره‌های این کانال‌ها را گرفته و به سمت انتهای آن‌ها حرکت می‌کنند. در طول مسیر، با اعمال میدان الکتریکی متناوب در فرکانس ۱ مگاهرتز و ولتاژ ۳ ولت، نیروی دی‌الکتروفورز مثبت اعمال‌شده و اسپرم‌های با تحرک کم را به دام انداخته اما اسپرم‌های با تحرک بالا توانایی فرار از میدان الکتریکی را داشته و خود را به قسمت خروجی کانال می‌رسانند. به‌منظور بررسی میدان الکتریکی و بررسی جریان سیال در سیستم طراحی‌شده، از نرم‌افزار کامسول استفاده گردید. بر مبنای طراحی و شبیه‌سازی انجام‌شده عملگر جداسازی اسپرم‌ها ساخته شد. نتایج آزمایش‌های بالینی نشان داد، تحرک اسپرم‌های خروجی سیستم طراحی‌شده نسبت به ورودی آن از ۵۴٪ به ۸۱٪ و حیات اسپرم‌ها نیز از ۵۶٪ به ۷۵٪، افزایش یافت.

Separation of healthy sperms using dielectrophoresis and thigmotaxis phenomena

Alireza Khouzestani¹, Mohammad Hossein Nasr-Esfahani², Yousef Hojjat^{3*}, Marziyeh Tavalae⁴, Hesam Sadeghian⁵

1- PhD Student, Department of Mechanical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Royan Biotechnology Research Institute, Royan Institute, Isfahan, Iran

3- Professor, Department of Mechanical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Royan Biotechnology Research Institute, Royan Institute, Isfahan, Iran

5- PhD, Department of Mechanical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* Corresponding Author's Email: Yhojjat@modares.ac.ir

Article Information

Original Research Paper

Received: 30 October 2023

Accepted: 28 February 2024

Keywords:

Sperm
Microfluidic
Dielectrophoresis
Separation
Thigmotaxis

Abstract

Separation of healthy sperm (motile and with the best DNA structure) is traditionally done by density gradient centrifugation or upward swimming methods. In recent years, microfluidic methods have been developed to separate motile sperm with the best morphology and DNA structure and will replace traditional methods in close future. Microfluidic systems require a smaller sample volume, which, in addition to higher purity, has advantages such as cost reduction and test time reduction. In this research, by using thigmotaxis phenomenon in which sperms follow the channel wall and also positive dielectrophoresis phenomenon in which traps the particles based on applying non uniform electric field, a microfluidic actuator is presented. By using a large number of microchannel parallel to each other, the motile sperm, follow the walls and move to the end of channels. Then, by applying 1 MHz in 3 V, the positive dielectrophoresis force traps the sperms with low motility, but the sperms with high motility have the ability to escape from the electric field and reach the outlet of the channel. In order to check the electric field and also the fluid flow in the channels, Comsol software was used. Based on the design and simulation, the sperm separation actuator was manufactured and tested. The clinical tests results showed that compared to the inlet of the device, the motility was increased from 54% to 81% and the viability was increased from 56% to 75% in the outlet of the manufactured system.

Please cite this article using:

برای ارجاع به این مقاله از عبارت ذیل استفاده نمایید:

Khouzestani A, Nasr-Esfahani MH, Hojjat Y, Tavalae M, Sadeghian H. Separation of healthy sperms using dielectrophoresis and thigmotaxis phenomena. Iranian Journal of Manufacturing Engineering. 2024 Feb 20;10(12):13-27. doi: 10.22034/IJME.2024.422437.1870 [In Persian]

۱- مقدمه

از بین هر شش زوج، حداقل یک زوج حداقل یکبار در سنین باروری نوعی نابرووری را تجربه کرده‌اند [۱]. در دهه‌های اخیر، تکنیک‌های مختلف کمک باروری، مانند تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم^۱ و لقاح آزمایشگاهی^۲، به‌طور گسترده‌ای برای بهبود نرخ باروری مورد استفاده قرار گرفته است. شناسایی و طبقه‌بندی اسپرم متحرک برتر با یکپارچگی DNA برای موفقیت‌آمیز بودن هر دو روش ذکر شده، حیاتی است. با توجه به ماهیت شکننده اسپرم‌ها، جداسازی اسپرم‌های باکیفیت با استفاده از تکنیک‌های مرسوم مانند شنا کردن به سمت بالا^۳ یا سانتریفیوژ گرادیان چگالی^۴ با چالش‌های متعددی از جمله امکان آسیب رساندن به یکپارچگی DNA اسپرم و زمان‌بر بودن، همراه بوده است [۲]. در سال‌های اخیر، تکنیک‌های میکروفلوئیدیکی به‌طور مداوم برای جداسازی اسپرم‌های متحرک برتر با بهترین مورفولوژی و یکپارچگی DNA توسعه‌یافته‌اند و به‌زودی جایگزین روش‌های مرسوم خواهند شد [۳]. سیستم‌های میکروسیال به حجم نمونه کمتری نیاز دارند که مزایای متعددی از جمله کاهش هزینه مواد، سازگاری با محیط‌زیست و غیره دارد [۴]. علاوه بر این، اندازه کوچک‌تر دستگاه و هزینه ساخت کمتر از دیگر مزایای چنین سیستم‌هایی است [۵]. کموتاکسی [۶]، ترموتاکسی [۷]، الکتروفورز [۸، ۹]، زتا پتانسیل [۱۰] و دی‌الکتروفورز [۱۱] از جمله روش‌های انتخاب سلولی فعال هستند که می‌توانند اسپرم سالم را در عملگرهای مرتب‌سازی اسپرم میکروسیالی جدا کنند. از جمله روش‌های غیرفعال جداسازی اسپرم می‌توان به دو روش رئوتاکسی و تیگموتاکسی اشاره کرد [۱۲]. در میان روش‌های فعال، در روش دی‌الکتروفورز نیروی وارد شده به ذرات سلولی که ابعادی در حد چند میکرون دارند، در مرتبه پیکونیوتن است که این میزان یک نیروی مناسب و قوی برای جداسازی محسوب می‌شود.

اخیراً، از نیروی دی‌الکتروفورز برای جابجایی یک سلول تکی نیز استفاده شده است [۱۳]، با این حال، عمدتاً از این پدیده در دستگاه‌های آزمایشگاه روی تراشه برای تجزیه و تحلیل و جداسازی نمونه‌های بیولوژیکی استفاده می‌شود [۱۴]. عملگرهای دی‌الکتروفورز از تفاوت خواص الکتریکی برای جداسازی استفاده می‌کنند. مزیت این عملگرها این است که می‌توانند ذرات را با خلوص و بازدهی بالا جدا کنند. علاوه بر این، دی‌الکتروفورز روشی است که در آن نیازی به لیبل گذاری سلول‌ها نمی‌باشد [۱۵، ۱۶]. دی‌الکتروفورز نیرویی است که بر یک ذره قطبش پذیر که در معرض یک میدان الکتریکی غیریکنواخت و معمولاً متغیر با زمان قرار گرفته، اعمال می‌شود. نیروی دی‌الکتروفورز را می‌توان با میدان الکتریکی DC نیز اعمال نمود [۱۷]. در این حالت معمولاً از عایق‌ها برای اعمال میدان الکتریکی غیریکنواخت استفاده می‌شود [۱۸]. بسته به خواص الکتریکی ذره و محیط، ذرات به مناطقی که میدان الکتریکی با شدت بالا وجود دارد جذب شده (دی‌الکتروفورز مثبت) یا از آن‌ها دفع می‌شوند (دی‌الکتروفورز منفی) [۱۹].

روش‌های متفاوتی مانند اعمال نیروی دی‌الکتروفورز منفی [۲۰]، استفاده از تفاوت در فرکانس‌های قطع^۵ [۲۱] و استفاده از تفاوت در میزان پلاریزه شدن [۲۲]، برای جداسازی اسپرم‌های سالم و افزایش نرخ باروری [۲۳] مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین در مطالعات اخیر از پدیده‌ی دی‌الکتروفورز برای انتخاب جنسیت نیز استفاده شده است. نیروی دی‌الکتروفورز بر روی اسپرم‌های X و Y به دلیل تفاوت در اندازه این اسپرم‌ها متفاوت بوده که از این مورد برای انتخاب جنسیت استفاده شده است [۲۴]. تفاوت در فرکانس قطع اسپرم گاو X و Y نیز برای انتخاب جنسیت مورد بررسی قرار گرفته است [۲۵]. از کاربردهای دیگر پدیده‌ی دی‌الکتروفورز، اندازه‌گیری نیروی رانش سلول‌های متحرک زمانی که در یک محیط معلق هستند می‌باشد. در این روش، نیروی رانش تاژک به جلو سلول در برابر دی‌الکتروفورز منفی قرار گرفته و با آن معادل‌سازی می‌شود [۲۶]. از این روش می‌توان برای اندازه‌گیری نیروی تولیدشده توسط تاژک یا همان دم اسپرم نیز استفاده کرد.

استفاده از رفتار دنبال کردن دیواره اسپرم‌ها برای جداسازی که به روش تیگموتاکسی نیز معروف است، یک روش جداسازی غیرفعال بوده که بر اساس پاسخ طبیعی اسپرم به اشیاء مکانیکی، به‌ویژه توانایی آن‌ها در مسیریابی و چسبندگی به سطوح تکیه دارد. به‌عبارت‌دیگر، هنگامی که اسپرم‌ها به یک دیواره برخورد می‌کنند، تمایل دارند این دیواره را گرفته و در امتداد آن حرکت کنند. این روش می‌تواند به نحو مؤثری اسپرم‌های با سرعت و حرکت مناسب را از اسپرم‌های با عملکرد ضعیف‌تر جدا کند. استفاده از تعداد زیادی کانال که به‌صورت شعاعی دور یک مخزن دایره‌ای شکل، قرار گرفته‌اند و در نهایت همگی به مرکز دایره که همان خروجی

¹ Intra Cytoplasmic Sperm Injection

² In Vitro Fertilization

³ Swim Up

⁴ Density Gradient Centrifuge

⁵ Cut of Frequency

سیستم بوده، می‌رسند، از جمله روش‌های جداسازی با این روش است [۲۷]. در روش دیگر، از کانال‌های طبقاتی استفاده شده که این کار منجر به افزایش دیواره‌ها شده و در نتیجه تعداد اسپرم‌های بیشتری وارد کانال‌ها می‌شوند [۲۸].

در این تحقیق سعی بر آن شده است تا با ارائه یک سیستم میکروفلوئیدیک نوین که با ترکیب دو روش دی‌الکتروفورز و تیگموتاکسی، ایجاد شده است، جداسازی اسپرم‌های سالم صورت پذیرد. در سیستم طراحی‌شده، تعداد ۱۰۰ عدد کانال میکروفلوئیدیک به صورت موازی با یکدیگر ساخته شده تا با تعداد زیاد کانال‌ها، تعداد دیواره‌ها و در نتیجه سطح تماس بیشتر شده و اسپرم‌های بیشتری بتوانند به انتهای کانال برسند. در طول مسیر حرکت اسپرم‌ها تا انتهای کانال‌های موازی، با اعمال میدان الکتریکی غیریکنواخت به الکترودهایی که در کف کانال قرار دارند، در فرکانس و ولتاژ مناسب پدیده‌ی دی‌الکتروفورز مثبت به اسپرم‌ها وارد شده و اسپرم‌های با تحرک کم را به دام می‌اندازد. در این حالت، از ورود اسپرم‌های با سرعت کمتر به خروجی کانال جلوگیری می‌شود، درحالی‌که اسپرم‌های با تحرک بالا، به الکترودها نچسبیده و به حرکت خود ادامه می‌دهند. استفاده از ترکیب این دو روش برای جداسازی اسپرم‌ها، برای اولین بار در این مقاله ارائه می‌گردد. سیستم طراحی‌شده با اسپرم‌های انسانی تست شده و نتایج تست‌های تحرک و حیات در خروجی دستگاه، کارایی و عملکرد مناسب سیستم جدید را نشان داد.

۲- طراحی و مدل‌سازی

۲-۱- تئوری دی‌الکتروفورز

یک ذره قابل قطبیده شدن، هنگامی که در میدان الکتریکی قرار می‌گیرد ممکن است یک دوقطبی تشکیل دهد. اگر میدان الکتریکی اعمال شده به ذره یکنواخت باشد، نیروی خالص اعمال شده به ذره صفر است؛ اما اگر ذره در یک میدان الکتریکی غیریکنواخت قرار داشته باشد، نیروی اعمال شده به ذره را می‌توان بر اساس معادله ۱ به دست آورد [۲۹].

$$F_{DEP} = (p \cdot \nabla) \quad (1)$$

در معادله فوق، P گشتاور دوقطبی القایی ذره در اثر میدان الکتریکی، ∇ عملگر دیفرانسیلی که برای تبدیل برداری استفاده می‌شود و E شدت میدان الکتریکی است. اگر ذره یک کره در نظر گرفته شود، پس از حل معادله لاپلاس بر حسب شرایط مرزی الکترواستاتیک، نتیجه نهایی به معادله ۲ منتهی می‌شود [۳۰].

$$\langle F_{DEP} \rangle = 2\pi\epsilon_m\epsilon_0 a^3 \text{Re}[k_W] \nabla |E|^2 \quad (2)$$

در معادله ۲، ϵ_0 و $\text{Re}[K_W]$ به ترتیب شعاع ذره، ضریب گذردهی محیط اطراف، ضریب گذردهی خلاء و قسمت حقیقی فاکتور کلایزوس-موسوتی را نشان می‌دهد. در صورتی که ذره یکنواخت باشد، K_W از رابطه ۳ به دست می‌آید.

$$K_W = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (3)$$

همان‌طور که در رابطه ۳ نشان داده شده است، علامت و مقدار K_W به میزان قطبیده شدن ذره و سیال اطراف بستگی دارد، به طوری که اختلاف بیشتر قطبیده شدن ذره و سیال اطراف، منجر به بیشتر شدن نیروی اعمالی به ذره می‌شود. قطبش بیشتر ذره در مقایسه با محیط اطراف آن منجر به مثبت شدن فاکتور کلایزوس-موسوتی شده و در نتیجه نیروی دی‌الکتروفورز مثبت به ذره وارد شده که می‌تواند آن را به سمت مناطقی با بیشترین گرادیان میدان الکتریکی هدایت کند. قطبش بیشتر سیال منجر به یک پدیده معکوس و دی‌الکتروفورز منفی می‌شود که در آن ذره از مناطقی با بیشترین گرادیان میدان الکتریکی دور می‌شود.

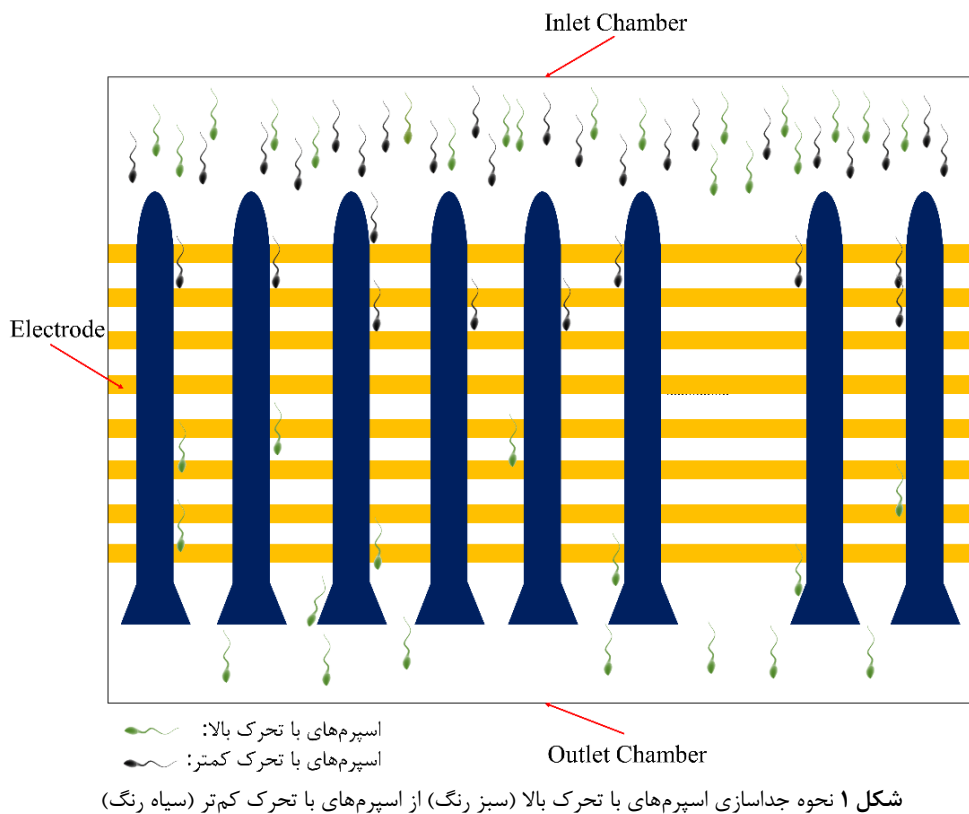
۲-۲- خاصیت تیگموتاکسی

از میان روش‌های غیرفعال، در روش تیگموتاکسی برخلاف روش رئوتاکسی که اسپرم‌ها را بر اساس توانایی آن‌ها در حرکت کردن خلاف جهت سیال جداسازی می‌کند، نیاز به پمپ سرنگی جهت ایجاد جریان سیال نیست که این مورد از جمله مزیت‌های این روش می‌باشد. به طور خلاصه، تیگموتاکسی یا رفتار دنبال کردن دیواره اسپرم، نشان‌دهنده توانایی اسپرم برای پاسخ دادن به نشانه‌های فیزیکی با دنبال کردن دقیق سطوح یا مرزها می‌باشد. برای اینکه بتوان جداسازی را بهتر نمود، می‌توان غلظت محیط را بالاتر برده تا اسپرم‌های با سرعت بالاتر بتوانند خود را به انتهای کانال یا همان خروجی برسانند. طول کانال‌ها نیز نقش به‌سزایی در جداسازی دارند،

در صورتی که طول کانال‌ها زیاد باشد، ممکن است اسپرم‌ها نتوانند به انتهای کانال برسند و در میانه کانال به دلیل وجود ناهمواری‌هایی که در ساخت وجود دارد، به دام بیفتند؛ از طرفی، در صورتی که طول کانال کم باشد، به دلیل آن‌که اسپرم‌های با تحرک کم نیز می‌توانند در امتداد دیواره حرکت کرده و خود را به انتهای کانال برسانند، جداسازی به نحو مناسبی صورت نپذیرفته است. لذا، انتخاب طول کانال پارامتری اساسی در استفاده از روش تیگموتاکسی است.

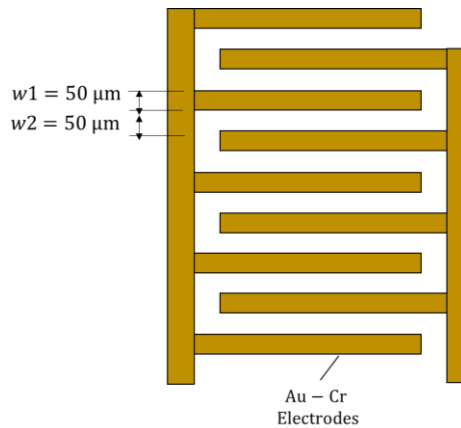
۲-۳- نحوه جداسازی

در این عملگر، نمونه که شامل اسپرم و دیگر سلول‌های موجود در مایع منی است، به یک کانال وارد می‌شود. اسپرم‌ها دیواره کانال‌های موازی در قسمت میانی را گرفته و در امتداد آن حرکت می‌کنند. الکترودها نیز در کف کانال‌های میانی قرار می‌گیرند. فرکانس و ولتاژ اعمالی به نحوی انتخاب می‌شود که اسپرم‌ها در قسمت میانی تحت دی‌الکتروفورز مثبت قرار گرفته و به کف کانال بچسبند. در نتیجه این کار، اسپرم‌های با تحرک کم به سمت جایی که بیشترین گرادیان میدان الکتریکی وجود دارد یعنی کف کانال که الکترودها تعبیه شده‌اند، متمایل شده و جذب گوشه الکترودها می‌گردند. اسپرم‌های سالم‌تر که دارای تحرک و سرعت بالاتری هستند، این توانایی را داشته که از میدان الکتریکی فرار کرده و به مسیر خود در امتداد دیواره ادامه دهند. بنابراین، در این حالت اسپرم‌های با تحرک کم در کف کانال چسبیده و اسپرم‌های با تحرک بالا به انتهای کانال در قسمت خروجی می‌رسند و در نتیجه عمل جداسازی انجام می‌شود (شکل ۱).



۲-۴- هندسه الکترودها و کانال

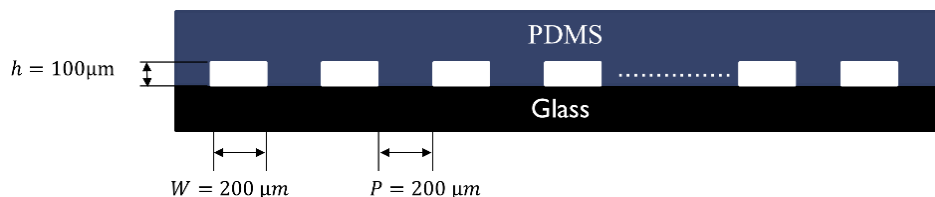
الکترودهای مورد استفاده برای تولید میدان الکتریکی مطابق شکل ۲ طراحی شده‌اند. فاصله بین الکترودها و همچنین عرض الکترودها ۵۰ میکرومتر بود. ضخامت الکترودها نیز ۱۲۰ نانومتر در نظر گرفته شد.



شکل ۲ هندسه الکترودهای طراحی شده

از آنجایی که از روش تیگموتاکسی در جداسازی استفاده می‌شود، بنابراین هندسه کانال بسیار حائز اهمیت است. در سیستم طراحی شده از سه قسمت ورودی، خروجی و میانی استفاده گردید. در قسمت ورودی مایع منی وارد شده، در قسمت میانی عملیات جداسازی انجام شده و در قسمت خروجی اسپرم‌های سالم استخراج می‌شوند. مهم‌ترین قسمت در این طراحی، قسمت میانی است. در این قسمت، تعداد زیادی کانال (۱۰۰ کانال) به صورت موازی در کنار یکدیگر قرار می‌گیرد. هر چه تعداد کانال‌های موازی بیشتر باشد، تعداد دیواره‌ها نیز بیشتر شده و بنابراین اسپرم‌های بیشتری به قسمت خروجی کانال می‌رسند. اسپرم‌ها پس از آن که به ورودی دستگاه تزریق می‌شوند، به دیواره کانال‌ها برخورد کرده و سپس آن‌ها را گرفته و در امتداد آن حرکت می‌کنند.

طول کانال‌های موازی در قسمت میانی ۴ میلی‌متر و عرض و ارتفاع کانال نیز به توجه به ابعاد اسپرم و اینکه گرفتگی در کانال ایجاد نشود و همچنین مطمئن بودن از وجود جریان لایه‌ای، مطابق با شکل ۳ طراحی گردید. نکته مهم دیگر طراحی کانال، ارتفاع قسمت ورودی و خروجی است. به منظور آن که بتوان حجم بیشتری از مایع منی را به قسمت ورودی دستگاه وارد کرده و در نتیجه بتوان تعداد اسپرم بیشتری را در قسمت خروجی دستگاه استخراج نمود، ارتفاع قسمت‌های ورودی و خروجی بیشتر از قسمت میانی و ۲ میلی‌متر در نظر گرفته شد. فاصله بین هر کانال (گام) نیز مشابه با عرض آن‌ها در نظر گرفته شد. از آنجایی که ارتفاع کانال‌های موازی ۱۰۰۰ برابر ضخامت الکترودها است، الکترودها تأثیر قابل توجهی بر جریان آرام در کانال‌ها ندارند.



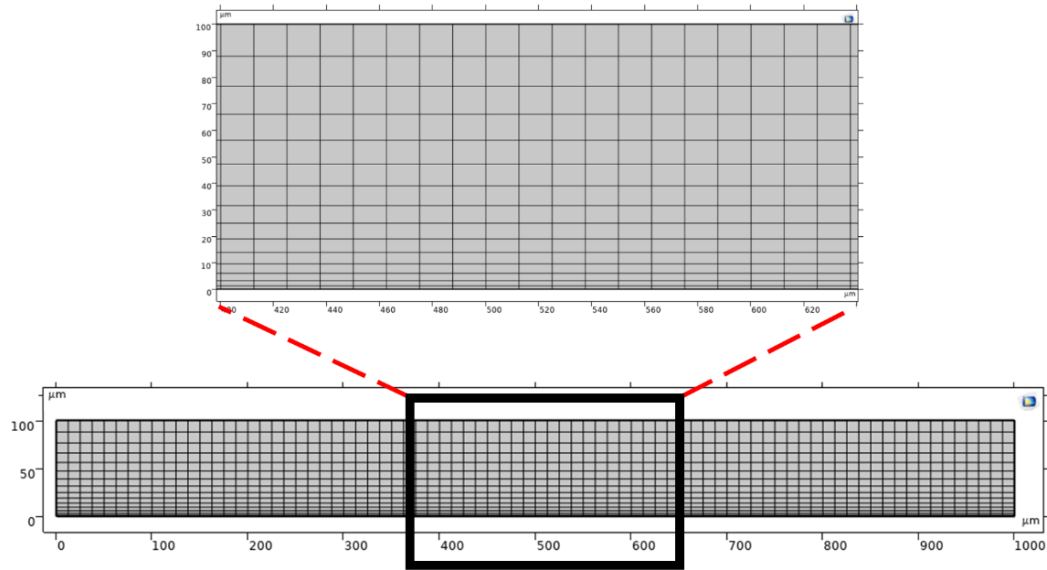
شکل ۳ هندسه کانال‌های موازی در قسمت میانی دستگاه، شامل عرض، گام و ارتفاع کانال‌ها

۲-۵- شبیه‌سازی

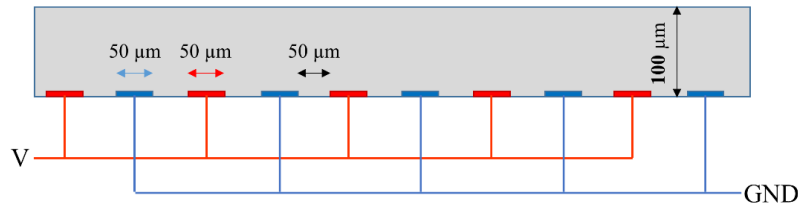
از نرم‌افزار کامسول مولتی‌فیزیک^۱ برای شبیه‌سازی میدان الکتریکی و همچنین نحوه حرکت جریان سیال، استفاده شد. شبیه‌سازی میدان الکتریکی در کانال، در دو بعد انجام شد زیرا هندسه و شرایط مرزی در طول عرض میکروکانال تغییری نکردند. برای مش بندی، از المان‌های ۴ ضلعی استفاده گردید. به دلیل آن که الکترودها در کف کانال قرار دارند، در کف کانال المان‌های ریزتری در نظر گرفته شد ولی در جهت طول کانال، توزیع مش به صورت یکنواخت در نظر گرفته شد. مدل با استفاده از روش مستقیم MUMPS^۲ و با ۲۰۴۱ المان حل شده است. در شکل ۴ شبکه‌بندی مدل و در شکل ۵ شرایط مرزی نشان داده شده است. لازم به ذکر است، استقلال از شبکه‌بندی نیز بررسی شد. نتایج نشان داد، در صورتی که تعداد المان‌ها بیشتر از ۱۳۲۶ عدد باشد، تغییری در نتایج رخ نمی‌دهد.

¹ COMSOL Multi-physics 6.1

² Multifrontal Massively Parallel Sparse Direct Solver

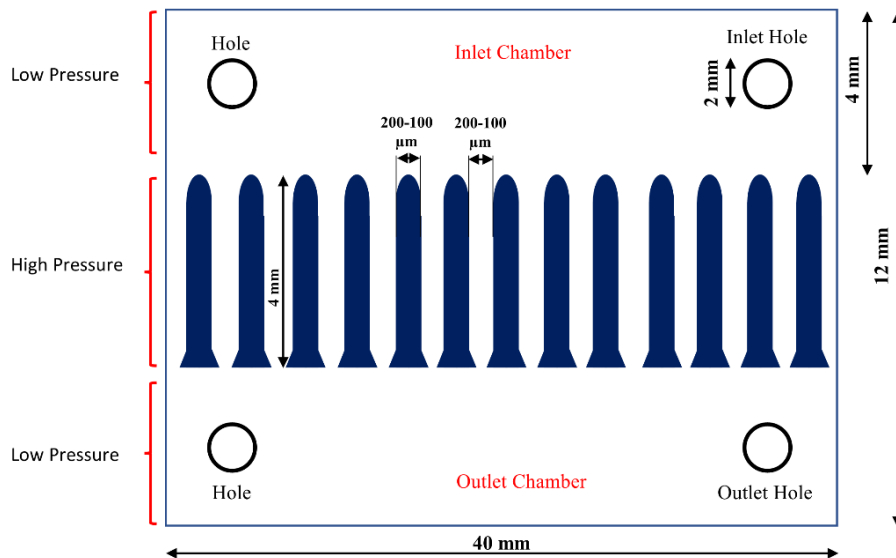


شکل ۴ مش بندی مدل طراحی شده به منظور اعمال نیروی دی‌الکتروفورز



شکل ۵ شرایط مرزی به منظور ایجاد میدان الکتریکی در کانال‌های موازی

به منظور شبیه‌سازی سیالاتی نیز، از مدل دوبعدی مطابق با شکل ۶ استفاده گردید. در این جا نیز به منظور حل مدل‌سازی از روش مستقیم MUMPS استفاده گردید. در این آنالیز، از المان‌های مثلثی در مش بندی استفاده گردید. توزیع شبکه‌بندی مدل ارائه شده به نحوی انتخاب شده است که در قسمت ورودی و خروجی کانال‌های میانی، المان‌ها کوچک تر و در دیگر نقاط المان‌ها بزرگ تر باشند. در کل این آنالیز با ۱۴۵۳۰ المان حل گردید. هدف از این شبیه‌سازی، بررسی ترکیب بافرها با یکدیگر در هنگام تزریق نمونه به داخل دستگاه بود. ارتفاع قسمت ورودی و خروجی ۲ میلی‌متر و ارتفاع کانال‌های موازی ۱۰۰ میکرون در نظر گرفته شد.



شکل ۶ هندسه کلی و شرایط مرزی سیستم طراحی شده، شامل کانال‌های میانی، مخزن‌های ورودی و خروجی و سوراخ‌های ورودی و خروجی

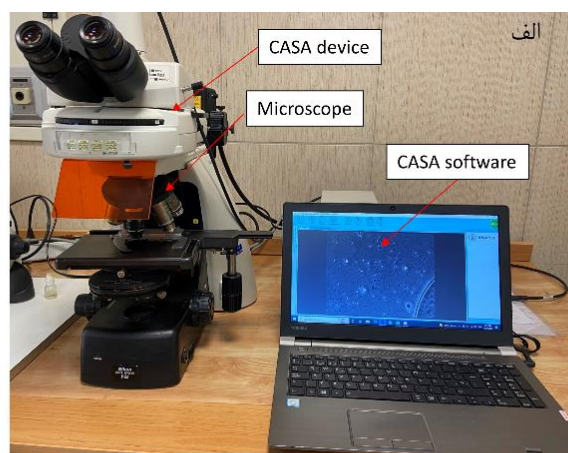
۳- مواد و روش‌ها

۳-۱- آماده‌سازی سلول‌ها و ساخت بافر

از سلول اسپرم انسان به‌منظور تست‌های آزمایشگاهی استفاده شد. در ابتدا، افراد در مورد هدف مطالعه و چشم‌انداز احتمالی آینده آن مطلع شدند. فرم رضایت‌نامه توسط هر یک از افراد مراجعه‌کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان امضا شد و بیماران نمونه مایع منی باقی‌مانده خود را برای این مطالعه اهدا کردند. برای اسپرم انسان، مایع منی تازه از هشت اهداکننده (۸ نفر) به دست آمد. این مطالعه با کد IR.ACECR.ROYAN.REC.1400.064 توسط کمیته اخلاق موسسه رویان تأیید شده است. از آنجایی که محیط مایع منی بسیار مغذی و با هدایت الکتریکی بالا است، نمی‌توان از آن به‌طور مستقیم در فرآیند دی‌الکتروفورز استفاده کرد، زیرا منجر به منفی شدن فاکتور کلایوس-موسوتی شده و ذرات از الکترودها دور می‌شوند. بنابراین یک بافر با رسانایی کمتر ساخته شد. بافر دی‌الکتروفورز اسپرم شامل ۲۰ سی‌سی آب دیونیزه، ۱٫۷ گرم ساکارز^۱ و ۰٫۰۶ گرم دکستروز^۲ بود، با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر آلبومین به محیط ساخته‌شده، هدایت الکتریکی روی مقدار $140 \mu\text{S}/\text{cm}$ تنظیم شد. اضافه کردن آلبومین به‌منظور حفظ تحرک اسپرم، انجام گردید. قبل از انجام تست، میکروکانال و سطح شیشه به مدت ۳۰ دقیقه در معرض پلی وینیل الکل (PVA) با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قرار گرفتند تا از چسبیدن اسپرم به آن‌ها جلوگیری شود. سپس میکروکانال با بافر دی‌الکتروفورز پر شد.

۳-۲- آزمایش اندازه‌گیری میزان تحرک و حیات اسپرم‌ها

از دستگاه کازا^۳ به‌منظور اندازه‌گیری میزان تحرک اسپرم استفاده گردید. دستگاه کازا با استفاده از پردازش تصویر به شناسایی حرکت زیگزاگی اسپرم می‌پردازد. پس از شناسایی حرکت‌ها، نرم‌افزار تعداد و درصد اسپرم‌های با سرعت پیش‌رونده زیاد و سرعت پیش‌رونده متوسط و همچنین اسپرم‌های بدون تحرک و مرده را به‌صورت جدا، محاسبه می‌کند. در شکل ۷ دستگاه کازا نشان داده شده است.



ب

	Total	%	M/mL	M/sample
Total	26	100.00%	1.08	2.70
Motile	22	84.62%	0.91	2.28
Progressive	20	76.92%	0.83	2.06
Rapid Progressive (type A)	6	23.08%	0.25	0.63
Medium Progressive (type B)	14	53.85%	0.58	1.45
Non Progressive (type C)	2	7.69%	0.08	0.20
Immotile (type D)	4	15.38%	0.17	0.43

شکل ۷ الف) دستگاه کازا به همراه نرم‌افزار آن (ب) خروجی آنالیز دستگاه کازا که اسپرم‌ها را به ۴ نوع اسپرم‌های با سرعت بالا (type A)، اسپرم‌های با سرعت متوسط (type B)، اسپرم‌های ثابت ولی با دم متحرک (type C) و اسپرم‌های بی‌تحرک (type D) تقسیم بندی می‌کند

¹ Sucrose

² Dextrose

³ Computer assisted semen analysis (CASA)

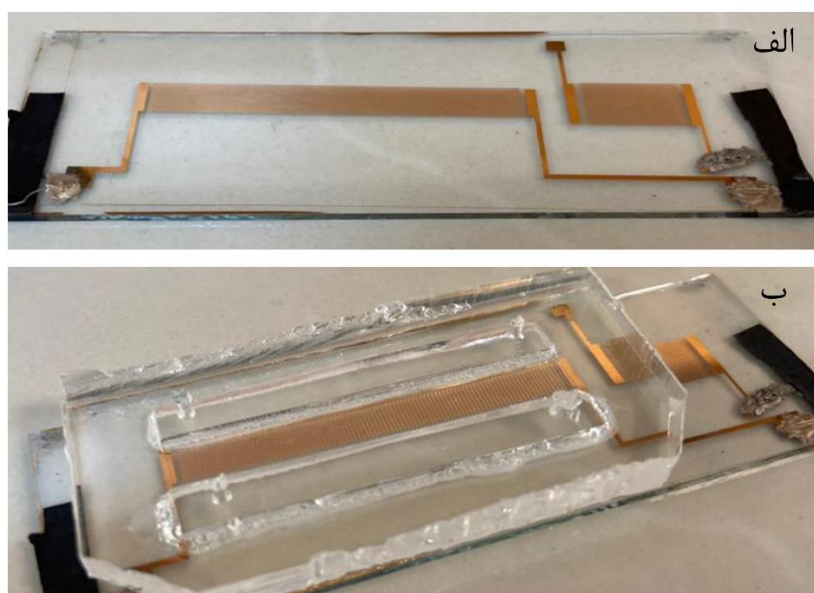
به‌منظور بررسی میزان زنده‌مانی یا همان حیات اسپرم‌ها، از آزمون تورم هیپو اسمتیک^۱ که اساس آن بر مبنای سالم بودن غشاء اسپرم‌های زنده استوار است، استفاده گردید. در این روش از محلول‌های هایپوتونیک استفاده می‌شود. سلول‌های زنده در محلول‌های هایپوتونیک متورم می‌شوند درحالی‌که سلول‌های مرده (که غشاء آسیب‌دیده دارند) فاقد این خاصیت می‌باشند. در صورتی‌که اسپرم‌ها زنده باشند، به دلیل ورود آب به آن‌ها، دماشان دچار پیچیدگی می‌شوند. اسپرم‌های مرده به‌صورت خط مستقیم در زیر میکروسکوپ دیده می‌شوند (شکل ۸).



شکل ۸ آزمون تورم هیپواسمتیک (الف) زنده بودن اسپرم به دلیل وجود انحنا در دم (ب) زنده نبودن اسپرم به دلیل عدم وجود انحنا در دم

۳-۳ ساخت الکترودها و کانال

در این عملگر از الکترودهای شانه‌ای استفاده می‌شود. برای ساخت الکترودها ابتدا یک لایه نازک کروم به ضخامت ۲۰ نانومتر بر روی بستر شیشه‌ای پوشش دهی شده و سپس یک لایه ۱۰۰ نانومتری طلا بر روی کروم قرار داده شد. طلا به دلیل پایداری الکتروشیمیایی و زیست‌سازگاری آن [۳۱] انتخاب شد. لایه‌های طلا و کروم با استفاده از روش رسوب فیزیکی بخار^۲ پوشش داده شد. سپس با روش پوشش دهی چرخشی^۳ روی لایه طلا یک فتورزیست قرار گرفته و برای ایجاد الگوی مورد نظر روی لایه، از روش فوتولیتوگرافی استفاده شد. در انتها لایه‌های طلا و کروم اچ شدند و لایه فتورزیست برداشته شد.



شکل ۹ الف) الکترودهای ساخته‌شده (ب) قرار گرفتن کانال روی الکترودها

^۱ Hypo-Osmotic swelling test (HOST)

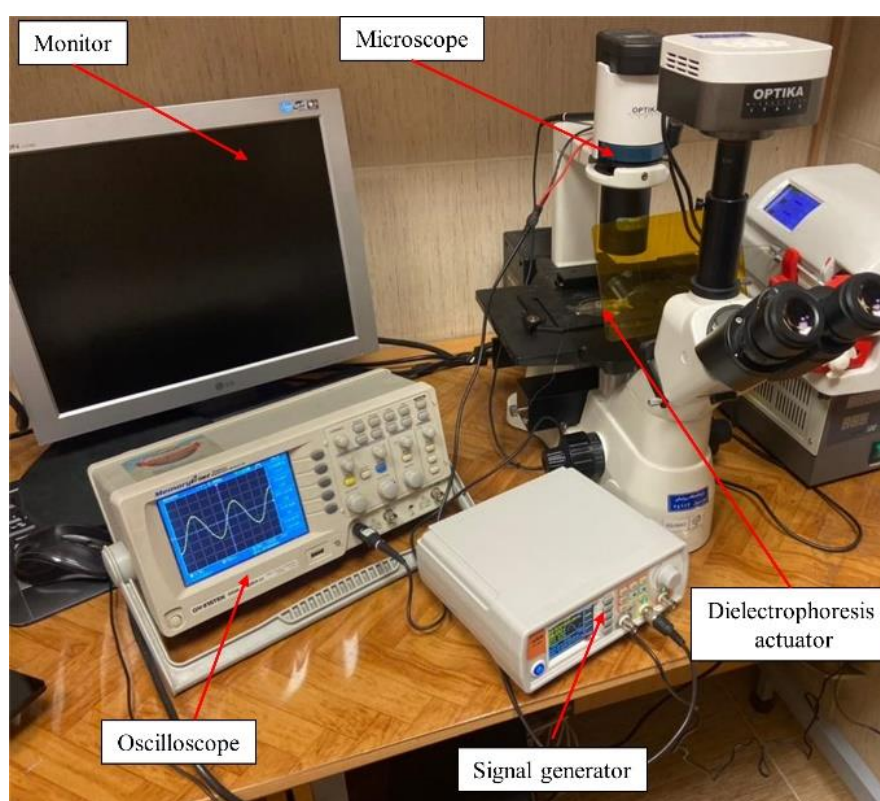
^۲ Physical Vapor Deposition (PVD)

^۳ Spin Coating

برای ساخت میکروکانال، پس از شستن زیرلایه ویفر سیلیکونی، فتورزیست SU-8 به روش پوشش دهی چرخشی رسوب داده شد. سپس از فوتولیتوگرافی برای ایجاد الگوی میکروکانال موردنظر بر روی لایه استفاده شد. در ادامه، قالب مورد نیاز برای ریخته‌گری PDMS با ظهور فتورزیست ساخته شد. با استفاده از پانچ، دو سوراخ به قطر ۲ میلی‌متر در قسمت ورودی و دو سوراخ مشابه هم در قسمت خروجی کانال‌ها ایجاد گردید. قرار گرفتن کانال روی الکترودها آخرین مرحله آماده‌سازی دستگاه برای آزمایش بود (شکل ۹).

۳-۴- مجموعه آزمایشگاهی

شکل ۱۰ مجموعه آزمایشگاهی مورد استفاده برای آزمایش‌ها را نشان می‌دهد. مجموعه شامل یک سیگنال ژنراتور برای اعمال میدان الکتریکی، یک میکروسکوپ معکوس برای مشاهده و کنترل فرایند، یک کامپیوتر برای مشاهده آزمایش‌ها و یک اسیلوسکوپ برای اندازه‌گیری سیگنال‌های خروجی بود. از میکروسکوپ معکوس برای نظارت بر فرآیند دی‌الکتروفورز استفاده شد. سیگنال ژنراتور و اسیلوسکوپ استفاده‌شده به صورت تجاری بوده و در کارخانه سازنده کالیبره شده‌اند. به منظور اندازه‌گیری دامنه ولتاژ اعمال‌شده توسط سیگنال ژنراتور به سیستم، از اسیلوسکوپ استفاده گردید. به دلیل فرکانس کاری بالا (در حدود ۱ مگاهرتز) ولتاژ اعمالی به سیستم افت داشته و میزان دقیق آن باید توسط اسیلوسکوپ اندازه‌گیری شود.



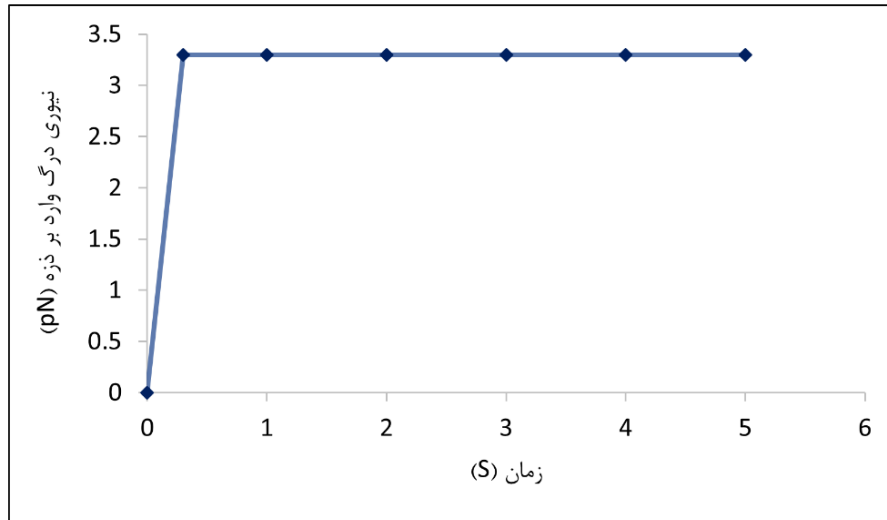
شکل ۱۰ مجموعه آزمایشگاهی شامل سیگنال ژنراتور، اسیلوسکوپ میکروسکوپ، مانیتور و عملگر دی‌الکتروفورز

۴- نتایج و بحث

۴-۱- نتایج شبیه‌سازی

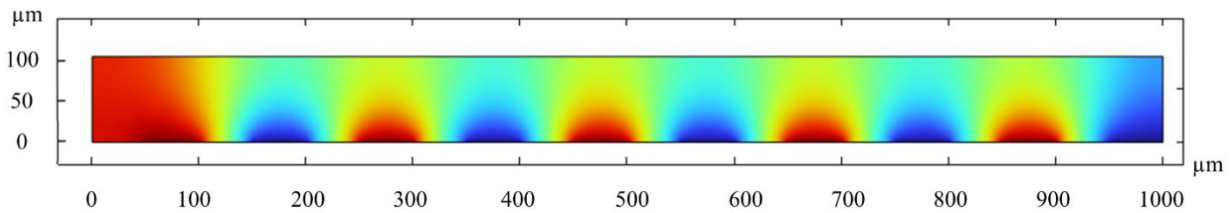
اسپرم‌ها جمعیت ناهمگن دارند یعنی خواص الکتریکی و مکانیکی از جمله ابعاد آن‌ها از یک سلول به سلول و از هر فرد به فرد دیگر تفاوت دارند. بنابراین در شبیه‌سازی‌های انجام‌شده، به منظور یکپارچگی معادلات، اسپرم یک کره با قطر ۵ میکرون در نظر گرفته شد [۳۲]. به منظور محاسبه نیروی اسپرم در حالت شبیه‌سازی، در ابتدا فرض شد که ذره در یک سیال قرار داشته که سرعت حرکت سیال صفر است. در ادامه، نیروی وارد به ذره آن قدر زیاد می‌شود که سرعت ذره به $70 \mu\text{m/s}$ برسد. نیروی درگی که در این سرعت به ذره وارد می‌شود معادل با نیروی اسپرم است. همان‌طور که در شکل ۱۱ مشخص است، در نیروی 3.3 pN ذره به سرعت $70 \mu\text{m/s}$ میکرومتر

بر ثانیه می‌رسد که این میزان سرعت یک اسپرم سالم است [۲۷]. لازم به ذکر است نیروی اسپرم سالم در دیگر تحقیقات نیز در همین حدود محاسبه شده است [۳۳]. این نیرو نشان‌دهنده آن است که در صورتی می‌توان یک اسپرم سالم را با روش‌های فیزیکی غیر تماسی (همانند دی‌الکتروفورز) جابه‌جا کرد که مرتبه نیرو نیز در محدوده پیکو نیوتن باشد.



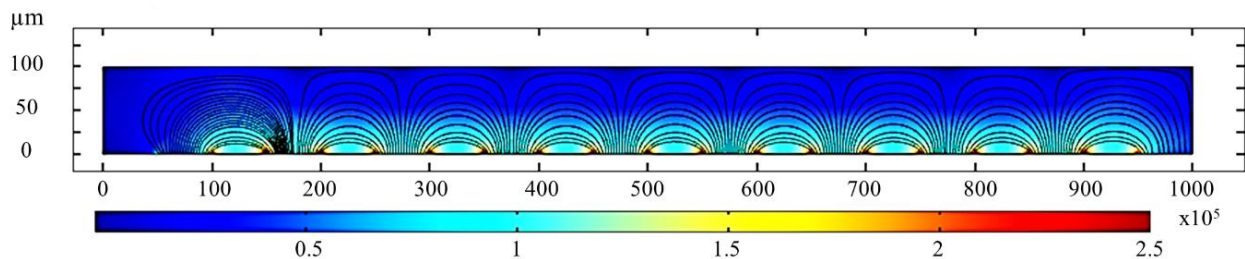
شکل ۱۱ نیروی درگ وارد به دژه با قطر ۵ میکرون هنگامی که سرعت حدی دژه به $70 \mu\text{m/s}$ می‌رسد

در کانال‌های موازی، پتانسیل الکتریکی مطابق با شکل ۱۲ توزیع می‌شود. ولتاژ مثبت و منفی ۴ ولت به الکترودها اعمال می‌شود.



شکل ۱۲ پتانسیل الکتریکی توزیع شده در کانال میکروفلوئیدیک $V_{pp} = 8 \text{ V}$

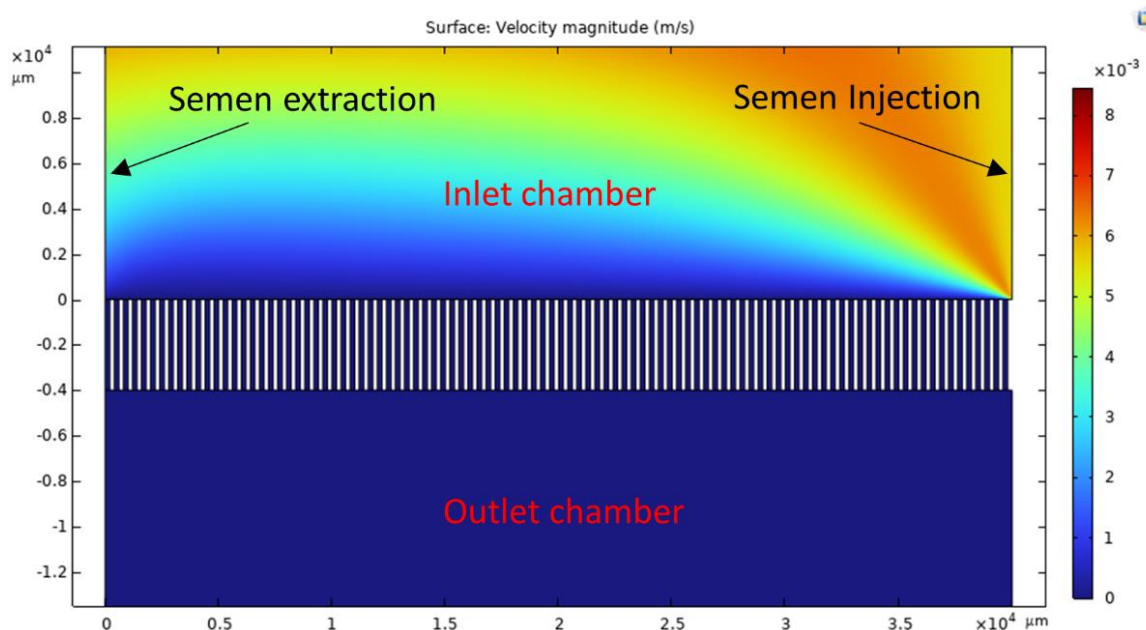
خطوط میدان الکتریکی و کانتور شدت آن در شکل ۱۳ نشان داده شده است. بیشترین گرادیان میدان الکتریکی در گوشه‌ی الکترودها وجود دارد. بنابراین، در پدیده‌ی دی‌الکتروفورز مثبت که ذرات به سمت مکانی که گرادیان میدان الکتریکی ماکزیمم است متمایل می‌شوند، در گوشه‌های الکترودها به دام می‌افتند.



شکل ۱۳ خطوط میدان و شدت میدان الکتریکی $V_{pp} = 8 \text{ V}$

به‌منظور بررسی میزان ترکیب شدن بافرهای کانال‌های ورودی و خروجی با بافر موجود در کانال‌های موازی ابتدا طرح موردنظر در نرم‌افزار به‌صورت پارامتری مدل گردید. همان‌طور که در قبل نیز ذکر گردید، سیستم طراحی‌شده، از یک قسمت ورودی و یک قسمت خروجی و یک قسمت میانی تشکیل شده است. در قسمت ورودی مایع منی وارد شده، اما در قسمت خروجی و میانی، بافر دی‌الکتروفورز قرار دارد. بافر قسمت ورودی نباید با بافر قسمت میانی و خروجی ترکیب شود. دلیل این امر خواص الکتریکی متفاوت بافر دی‌الکتروفورز با مایع منی است. در قسمت میانی که عمل جداسازی انجام می‌شود لازم است اسپرم‌ها با محیط دی‌الکتروفورز در تماس باشند. با تغییر عرض کانال و ارتفاع کانال، میزان ترکیب‌شده بافرها نیز تغییر می‌کند. با توجه به شبیه‌سازی‌های انجام‌شده، در صورتی که عرض کانال ۱۰۰ میکرون یا ۲۰۰ میکرون در نظر گرفته‌شده و ارتفاع کانال نیز ۱۰۰ میکرون باشد، ترکیب شدن بافرها صورت نمی‌گیرد. از دیگر پارامترهای مهم در انتخاب عرض و ارتفاع کانال، اندازه سلول اسپرم انسان است، که طول آن حدود ۵۰ میکرون می‌باشد. بنابراین نمی‌توان عرض و ارتفاع کانال را کمتر از این مقدار در نظر گرفت. در قسمت ورودی دو سوراخ به‌منظور تزریق نمونه به داخل کانال در نظر گرفته شد. همان‌طور که در شکل ۱۴ مشخص است، به دلیل آنکه فشار در کانال‌های میانی زیاد بوده، بنابراین سیال ورودی وارد این کانال‌ها نشده و از قسمت سمت چپ کانال خارج گشته و بافرها با یکدیگر ترکیب نمی‌شوند. لازم به ذکر است، وجود دو سوراخ در قسمت ورودی لازمی ترکیب نشدن بافرها با یکدیگر می‌باشد.

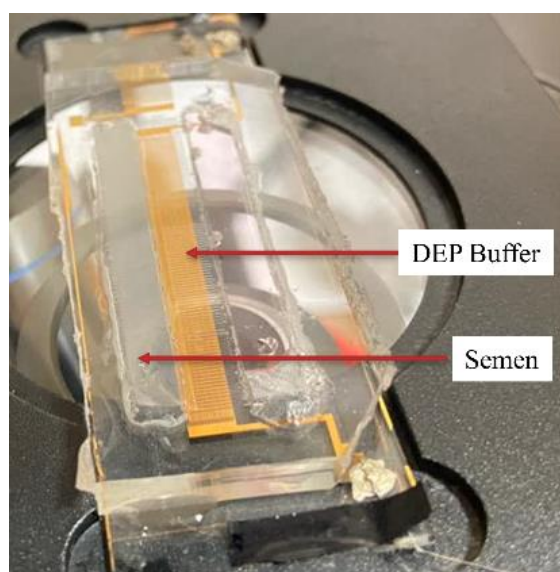
در این شبیه‌سازی، سیال با دبی ۱۰۰ میلی‌لیتر بر ساعت از سمت راست مخزن ورودی، تزریق می‌گردد. به دلیل فشار کمتر در مخزن ورودی نسبت به کانال‌های میانی (که به خاطر وجود سوراخ سمت چپی در مخزن ورودی است)، تمامی بافر به سمت سوراخ سمت چپ مخزن ورودی حرکت کرده و از آن خارج می‌شود.



شکل ۱۴ آنالیز سیالاتی به‌منظور بررسی ترکیب نشدن بافرها- مایع منی از سمت راست مخزن ورودی، تزریق می‌گردد. به دلیل فشار کمتر در مخزن ورودی نسبت به کانال‌های میانی، تمامی مایع منی به سمت سوراخ سمت چپ مخزن ورودی حرکت کرده و از آن خارج می‌شود.

۴-۲- ترکیب نشدن بافرها در آزمایش‌ها

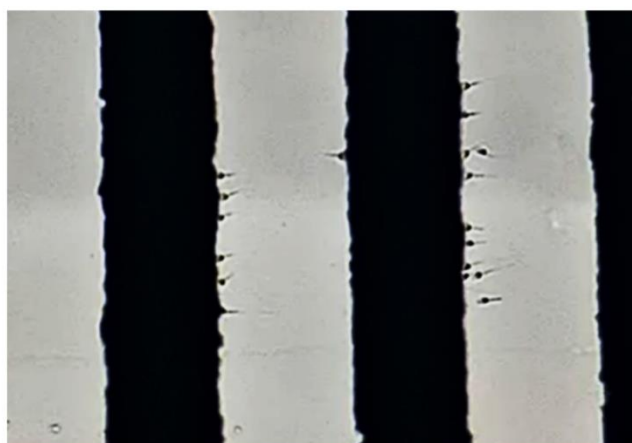
از آنجایی که بافر دی‌الکتروفورز دارای هدایت الکتریکی پایینی است بنابراین نمی‌توان از آن محیط به‌عنوان محیط تغذیه اسپرم‌ها استفاده نمود. مطابق با آزمایش‌های انجام‌شده، در صورتی که اسپرم‌ها حدود ۳۰ دقیقه در بافر دی‌الکتروفورز قرار بگیرند، تحرک خود را از دست می‌دهند. بنابراین، طراحی انجام‌شده بدین‌صورت انجام گرفت که اسپرم‌ها کمترین زمان ممکن در معرض بافر دی‌الکتروفورز قرار بگیرند. ترکیب نشدن بافرها در شکل ۱۵ نشان داده‌شده است. ترکیب نشدن بافرها، لازمی استفاده از روش دی‌الکتروفورز است.



شکل ۱۵ ترکیب نشدن بافرها- مایع منی به کانال‌های میانی که بافر دی‌الکتروفورز در آن قرار دارد، وارد نشده است.

۴-۳- تست تجربی پدیده دی‌الکتروفورز بر روی اسپرم انسان

وقتی ضریب نفوذ ذره به سیال اطراف آن بیشتر است، این باعث می‌شود که فاکتور کلازیوس-موستی آن مقدار مثبتی داشته باشد. در این حالت، ذرات تمایل دارند به سمت نقطه‌ای حرکت کنند که گرادیان میدان الکتریکی در آن نقطه بیشترین مقدار را داشته باشد، که این نقطه همان گوشه‌ی الکترودها است. در شکل ۱۶ اسپرم‌های چسبیده به الکترودها تحت اثر دی‌الکتروفورز مثبت نشان داده شده است. با افزایش زمان، اسپرم‌های بیشتری به الکترودها می‌چسبند. با توجه به تست‌های انجام‌شده، مشاهده گردید، در صورتی که در فرکانس کاری ۱ مگاهرتز و بیشتر از ۸ ولت به سیستم اعمال شود، به دلیل نیروی دی‌الکتروفورز بیشتر از ۳،۳ پیکونیوتن، تمامی اسپرم‌ها به دام می‌افتند. این مورد با جزئیات بیشتر در دیگر تحقیق انجام‌شده توسط نویسندگان مطالعه شده است [۳۴].

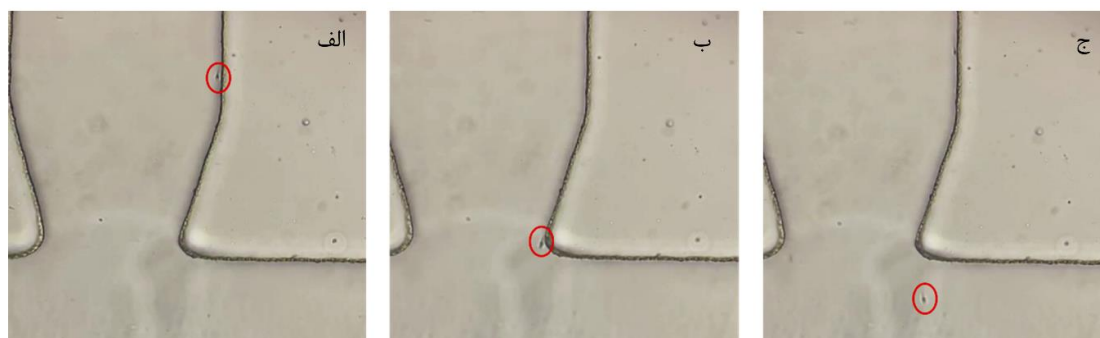


شکل ۱۶ چسبیدن اسپرم‌ها به لبه‌های الکترودها در اثر نیروی دی‌الکتروفورز مثبت

این نکته حائز اهمیت است که در ولتاژهای بالاتر به دلیل داغ شدن سیال دمای محیط بالا رفته و اسپرم‌ها پس از مدتی دچار مرگ می‌شوند. بنابراین نمی‌توان ولتاژ را از حدی بیشتر بالاتر برد. همچنین با بیشتر شدن دمای سیال، جریان الکترواسمزی متناوب در کانال ایجاد شده که کنترل پذیری آزمایش را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از طرف دیگر، با بالا رفتن هدایت الکتریکی سیال مورد استفاده نیز، اسپرم‌ها نیروی دی‌الکتروفورز منفی را تجربه کرده و از الکترودها دور می‌شوند. این دو محدودیت می‌بایست در آزمایش‌ها مد نظر قرار گیرند.

۴-۴- جداسازی اسپرم‌های سالم از ناسالم

به‌منظور اعمال میدان الکتریکی غیریکنواخت، باید فرکانس و ولتاژ اعمالی به نحوی انتخاب شود که اسپرم‌های با تحرک کم توسط الکترودها جذب‌شده ولی اسپرم‌های با تحرک بالا بتوانند از میدان الکتریکی فرار کنند. فرکانس ۱ مگاهرتز به اسپرم‌ها نیروی دی‌الکتروفورز مناسبی وارد می‌شود. بنابراین از این فرکانس در تست‌ها استفاده گردید. عامل تعیین‌کننده برای میزان جداسازی، مقدار ولتاژ اعمالی می‌باشد. با توجه به تست‌های انجام‌شده، مشاهده گردید، ولتاژ ۲ تا ۳ ولت، میزانی بود که در آن اسپرم‌های با تحرک کم به دام افتاده ولی اسپرم‌های با تحرک مناسب توانستند به حرکت خود ادامه دهند. دهانه خروجی کانال‌ها طوری طراحی و ساخته شده‌اند که اسپرم‌ها هنگامی که به انتهای کانال‌ها می‌رسند، از آن جدا شوند. در صورتی که این زاویه به‌درستی طراحی نشود، اسپرم‌ها پس از رسیدن به انتهای کانال، از دیواره جدا نشده و پس از دور زدن به سمت کانال ورودی کناری حرکت می‌کنند. در شکل ۱۷ این پدیده نشان داده شده است.



شکل ۱۷ الف) حرکت اسپرم در امتداد دیواره ب) رسیدن اسپرم به دهانه‌ی خروجی ج) جدا شدن اسپرم از دیواره به دلیل انتخاب زاویه مناسب

۴-۵- پارامترهای خروجی سیستم طراحی شده

در شکل ۱۸ نتایج تست‌های تحرک و حیات اسپرم در ورودی و خروجی دستگاه باهم مقایسه شده‌اند. مطابق با نتایج به‌دست آمده، هم تحرک و هم حیات اسپرم در خروجی سیستم، بهبود یافتند. همان‌طور که مشخص است، تحرک اسپرم‌های خروجی نسبت به ورودی از ۵۴٪ به ۸۱٪ و حیات آن از ۵۶٪ به ۷۵٪، افزایش یافته است. لازم به ذکر است، در این پژوهش سعی بر آن شد تا از نمونه‌هایی با میزان تحرک بین ۴۰ تا ۶۰ درصد استفاده شود. به دلیل آن‌که اسپرم‌های بیشتری برای تست حیات موردنیاز بود، بنابراین خروجی به دست آمده از تراشه، سانتی‌فیوژ گردید. به همین دلیل حیات اسپرم نسبت به تحرک آن به میزان کمتری بهبود یافته است. به‌عبارت‌دیگر، سانتی‌فیوژ باعث مردن اسپرم‌ها گردید [۳۵]. به‌منظور آنالیز نتایج و معنادار بودن آن از نرم‌افزار SPSS (قسمت Paired Sample T-Test) استفاده گردید. در این آنالیز مقدار عدد p (P value) کمتر از ۰,۰۰۱ شده که نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج تحقیق است.



شکل ۱۸ نتایج تست‌های تحرک و حیات اسپرم برای ورودی و خروجی دستگاه

۵- نتیجه‌گیری

در این تحقیق با استفاده از ترکیب دو روش دی‌الکتروفورز و تیگموتاکسی یا همان خاصیت دنبال کردن دیواره در اسپرم، یک دستگاه میکروفلوئیدیک برای جداسازی اسپرم‌های سالم از ناسالم طراحی و ساخته شد. این دستگاه از یک قسمت ورودی، یک قسمت خروجی و تعداد زیادی کانال میکروفلوئیدیک در قسمت میانی که به صورت موازی در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند، ساخته شد. از آنجایی که محیط تغذیه اسپرم یک محیط با هدایت الکتریکی بالا است، اما بافر دی‌الکتروفورز باید دارای هدایت الکتریکی پایینی باشد، بنابراین نمی‌توان از این بافر به عنوان محیط تغذیه اسپرم استفاده نمود. برای حل این مشکل، دستگاه موردنظر طوری طراحی شد که اسپرم‌ها زمان کمی در معرض بافر دی‌الکتروفورز قرار بگیرند. این کار با در نظر گرفتن ارتفاع کمتر کانال‌های میانی در مقایسه با قسمت ورودی و خروجی ممکن شد. دهانه‌ی خروجی کانال‌های میانی طوری ساخته شدند، که اسپرم‌ها پس از رسیدن به آن‌ها از آن جدا شده و وارد قسمت خروجی شوند. با توجه به تست‌های انجام‌شده، مشاهده گردید که در فرکانس ۱ مگاهرتز با اعمال ولتاژ ۲ تا ۳ ولت، اسپرم‌های با تحرک کم به دام افتاده ولی اسپرم‌های با تحرک مناسب توانستند به حرکت خود ادامه دهند. نتایج حاصل آزمایش‌های انجام‌شده نشان داد که تحرک و حیات اسپرم‌ها در خروجی به ترتیب ۰.۸٪ و ۰.۷۵٪ به دست آمده، که نسبت به ورودی به میزان قابل‌ملاحظه‌ای بهبود یافته است. لازم به ذکر است، به منظور بررسی عملکرد دستگاه بر روی نمونه‌هایی با درصد تحرک کمتر و اثربخشی جداسازی روش ارائه شده بر آن‌ها، تحقیقات بیشتری نیاز است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از حمایت مالی پارک علم و فناوری دانشگاه تربیت مدرس از این تحقیق قدردانی می‌نمایند.

References

- [1] Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. Reproductive biomedicine online. 2001 Jan 1;2(1):173-85. doi: 10.1016/S1472-6483(10)62193-1
- [2] Zini A, Finelli A, Phang D, Jarvi K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. Urology. 2000 Dec 1;56(6):1081-4. doi: 10.1016/S0090-4295(00)00770-6
- [3] Sarbandi IR, Lesani A, Moghimi Zand M, Nosrati R. Rheotaxis-based sperm separation using a biomimicry microfluidic device. Scientific reports. 2021 Sep 15;11(1):18327. doi: 10.1038/s41598-021-97602-y
- [4] Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. nature. 2006 Jul 27;442(7101):368-73. doi: 10.1038/nature05058
- [5] Reyes DR, Iossifidis D, Auroux PA, Manz A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. Analytical chemistry. 2002 Jun 15;74(12):2623-36. doi: 10.1021/ac0202435
- [6] Xie L, Ma R, Han C, Su K, Zhang Q, Qiu T, Wang L, Huang G, Qiao J, Wang J, Cheng J. Integration of sperm motility and chemotaxis screening with a microchannel-based device. Clinical chemistry. 2010 Aug 1;56(8):1270-8. doi: 10.1373/clinchem.2010.146902
- [7] Pérez-Cerezales S, Laguna-Barraza R, de Castro AC, Sánchez-Calabuig MJ, Cano-Oliva E, de Castro-Pita FJ, Montoro-Buils L, Pericuesta E, Fernández-González R, Gutiérrez-Adán A. Sperm selection by thermotaxis improves ICSI outcome in mice. Scientific Reports. 2018 Feb 13;8(1):2902. doi: 10.1038/s41598-018-21335-8
- [8] Ainsworth CJ, Nixon B, Aitken RJ. The electrophoretic separation of spermatozoa: an analysis of genotype, surface carbohydrate composition and potential for capacitation. International Journal of Andrology. 2011 Oct;34(5pt2):e422-34. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01164.x
- [9] Simon L, Murphy K, Aston KI, Emery BR, Hotaling JM, Carrell DT. Micro-electrophoresis: a noninvasive method of sperm selection based on membrane charge. Fertility and Sterility. 2015 Feb 1;103(2):361-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.10.047
- [10] Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalae M, Sekhavati MH, Gourabi H. Zeta sperm selection improves pregnancy rate and alters sex ratio in male factor infertility patients: a double-blind, randomized clinical trial. International Journal of Fertility & Sterility. 2016 Jul;10(2):253. doi: 10.22074/ijfs.2016.4917
- [11] de Wagenaar B, Dekker S, de Boer HL, Bomer JG, Olthuis W, van den Berg A, Segerink LI. Towards microfluidic sperm refinement: impedance-based analysis and sorting of sperm cells. Lab on a Chip. 2016;16(8):1514-22. doi: 10.1039/C6LC00256K
- [12] Ahmadvani N, Saadatmand M, Kazemnejad S, Abdekhodaie M. Qualified sperm selection based on the rheotaxis and thigmotaxis in a microfluidic system. Biomedical Engineering Letters. 2023 Jun 6:1-0.

- [13] Zaman MA, Padhy P, Wu M, Ren W, Jensen MA, Davis RW, Hesselink L. Controlled transport of individual microparticles using dielectrophoresis. *Langmuir*. 2022 Dec 21;39(1):101-10. doi: [10.1021/acs.langmuir.2c02235](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02235)
- [14] Riccardi M, Martin OJ. Electromagnetic forces and torques: From dielectrophoresis to optical tweezers. *Chemical Reviews*. 2023 Jan 31;123(4):1680-711. doi: [10.1021/acs.chemrev.2c00576](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00576)
- [15] Gascoyne PR, Noshari J, Anderson TJ, Becker FF. Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis. *Electrophoresis*. 2009 Apr;30(8):1388-98. doi: [10.1002/elps.200800373](https://doi.org/10.1002/elps.200800373)
- [16] Sadeghian H, Hojjat Y, Soleimani M. Interdigitated electrode design and optimization for dielectrophoresis cell separation actuators. *Journal of Electrostatics*. 2017 Apr 1;86:41-9. doi: [10.1002/elps.200800373](https://doi.org/10.1002/elps.200800373)
- [17] Li D, Yu W, Zhou T, Li M, Song Y, Li D. Conductivity-difference-enhanced DC dielectrophoretic particle separation in a microfluidic chip. *Analyst*. 2022;147(6):1106-16. doi: [10.1039/D1AN02196F](https://doi.org/10.1039/D1AN02196F)
- [18] Coll De Peña A, Mohd Redzuan NH, Abajorga MK, Hill N, Thomas JA, Lapizco-Encinas BH. Analysis of bacteriophages with insulator-based dielectrophoresis. *Micromachines*. 2019 Jul 4;10(7):450. doi: [10.3390/mi10070450](https://doi.org/10.3390/mi10070450)
- [19] Khoshmanesh K, Nahavandi S, Baratchi S, Mitchell A, Kalantar-zadeh K. Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011 Jan 15;26(5):1800-14. doi: [10.1016/j.bios.2010.09.022](https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.022)
- [20] Fuhr G, Müller T, Baukloh V, Lucas K. High-frequency electric field trapping of individual human spermatozoa. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1998 Jan 1;13(1):136-41. doi: [10.1093/humrep/13.1.136](https://doi.org/10.1093/humrep/13.1.136)
- [21] Garcia MM, Ohta AT, Walsh TJ, Vittinghof E, Lin G, Wu MC, Lue TF. A noninvasive, motility independent, sperm sorting method and technology to identify and retrieve individual viable nonmotile sperm for intracytoplasmic sperm injection. *The Journal of urology*. 2010 Dec 1;184(6):2466-72. doi: [10.1016/j.juro.2010.08.026](https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.08.026)
- [22] Rosales-Cruzaley E, Cota-Elizondo PA, Sánchez D, Lapizco-Encinas BH. Sperm cells manipulation employing dielectrophoresis. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2013 Oct;36(10):1353-62. doi: [10.1007/s00449-012-0838-6](https://doi.org/10.1007/s00449-012-0838-6)
- [23] Huang HY, Kao WL, Wang YW, Yao DJ. Using a dielectrophoretic microfluidic biochip enhanced fertilization of mouse embryo in vitro. *Micromachines*. 2020 Jul 23;11(8):714. doi: [10.3390/mi11080714](https://doi.org/10.3390/mi11080714)
- [24] Koh JB, Marcos. Effect of dielectrophoresis on spermatozoa. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2014 Oct;17:613-22. doi: [10.1007/s10404-014-1342-x](https://doi.org/10.1007/s10404-014-1342-x)
- [25] Wongtawan T, Dararatana N, Thongkittidilok C, Kornmatitsuk S, Oonkhanond B. Enrichment of bovine X-sperm using microfluidic dielectrophoretic chip: A proof-of-concept study. *Heliyon*. 2020 Nov 1;6(11). doi: [10.1016/j.heliyon.2020.e05483](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05483)
- [26] Hughes MP, Morgan H. Measurement of bacterial flagellar thrust by negative dielectrophoresis. *Biotechnology progress*. 1999;15(2):245-9. doi: [10.1021/bp990019+](https://doi.org/10.1021/bp990019+)
- [27] Nosrati R, Vollmer M, Eamer L, San Gabriel MC, Zeidan K, Zini A, Sinton D. Rapid selection of sperm with high DNA integrity. *Lab on a Chip*. 2014;14(6):1142-50. doi: [10.1039/C3LC51254A](https://doi.org/10.1039/C3LC51254A)
- [28] Vasilescu SA, Ding L, Parast FY, Nosrati R, Warkiani ME. Sperm quality metrics were improved by a biomimetic microfluidic selection platform compared to swim-up methods. *Microsystems & Nanoengineering*. 2023 Mar 28;9(1):37. doi: [10.1038/s41378-023-00501-7](https://doi.org/10.1038/s41378-023-00501-7)
- [29] Jones TB. Electromechanics of particles. (No Title). 1995 Oct 27.
- [30] Abd Rahman N, Ibrahim F, Yafouz B. Dielectrophoresis for biomedical sciences applications: A review. *Sensors*. 2017 Feb 24;17(3):449. doi: [10.3390/s17030449](https://doi.org/10.3390/s17030449)
- [31] Ghomian T, Hihath J. Review of dielectrophoretic manipulation of micro and nanomaterials: Fundamentals, recent developments, and challenges. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2022 Jun 15. doi: [10.1109/TBME.2022.3183167](https://doi.org/10.1109/TBME.2022.3183167)
- [32] Elgeti J, Kaupp UB, Gompper G. Hydrodynamics of sperm cells near surfaces. *Biophysical journal*. 2010 Aug 9;99(4):1018-26.
- [33] Nascimento JM, Shi LZ, Meyers S, Gagneux P, Loskutoff NM, Botvinick EL, Berns MW. The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates. *Journal of the Royal Society Interface*. 2008 Mar 6;5(20):297-302. doi: [10.1098/rsif.2007.1118](https://doi.org/10.1098/rsif.2007.1118)
- [34] Khouzestani A, Hojjat Y, Tavalae M, Sadeghian H, Nasr-Esfahani MH. Enhancing the Accuracy of Measuring DEP Force Applied on Cells by Considering the Friction Effect. *Biosensors*. 2023 May 12;13(5):540.
- [35] Makler A, Jakobi P. Effects of shaking and centrifugation on human sperm motility. *Archives of andrology*. 1981 Jan 1;7(1):21-6.