

طراحی و شبیه‌سازی یک سیستم میکروسیالی نوین برای انتخاب و پالایش اسپرم پویا با استفاده از الکتروفورسیس

مصیب شیری (کارشناسی ارشد)

مهدی مقیمی زند* (استادیار)

دانشکده‌ی مهندسی مکانیک، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران

مهندسی مکانیک شریف، پاییز ۱۳۹۶ (۱۰-۹-۲۰۱۳ شماره ۲، ص. ۱۰-۹-۲۰۱۳)

از آن‌جا که پویابودن یک پارامتر مهم در تعیین کیفیت اسپرم است، عملیاتی که بتواند اسپرم‌های پویا را به بهترین شکل و کمترین خطر جدا کند، برای درمان ناباروری مطلوب است. در میان راه‌های مختلف برای جداسازی و سرزند کردن اسپرم‌های پویاتر، روش‌هایی که از میکروکانال استفاده می‌کنند، از نظر سادگی و کاربرپسندی و سازگاری با طبیعت از دیگر روش‌ها پیش افتاده‌تر هستند. سئو و همکاران (۲۰۰۷) سیستمی را طراحی کرده‌اند که متشکل از چهار کانال و سه مخزن است. در این طراحی جریان موجود در کانال‌ها با استفاده از فشار هیدرواستاتیک، ناشی از ارتفاع سیال در مخازن، تولید می‌شود و با ایجاد یک جریان معکوس در کانال اصلی فقط به اسپرم‌های پویا اجازه‌ی شنا در خلاف جهت جریان داده می‌شود. در این پژوهش، سیستم طراحی شده توسط سئو با استفاده از نرم‌افزار گمیت شبکه‌بندی و به‌وسیله‌ی نرم‌افزار فلونت تحلیل شده است. ابتدا، نتایج سئو اعتبارسنجی شده و سپس اندازه‌ی مناسب میکروکانال‌ها انتخاب شده که طول کانال اصلی برابر ۵ mm پیشنهاد شده است. همچنین با استفاده از این سیستم بهینه‌شده و مبانی الکتروفورسیس، سیستم میکروسیالی متشکل از یک میدان الکترواستاتیک و سیستم چهارکاناله به‌منظور جداسازی و پالایش اسپرم‌های پویا طراحی شده است.

msb.shiri@gmail.com
mahdimoghimi@ut.ac.ir

واژگان کلیدی: اسپرم، اسپرم پویا، جداسازی اسپرم، میکروسیال، میکرواینجکشن.

۱. مقدمه

به ششستوی اسپرم‌ها^۳، مهاجرت اسپرم‌ها^۴، رسوب‌گذاری اسپرم‌ها^۵، فیلتراسیون^۶، سانتریفیوژ و استفاده از تغییرات چگالی^۷، استفاده از شارژ الکتریکی سطح اسپرم مانند روش‌های الکتروفورسیس و زتا، استفاده از مغناطیس^۸، و جداسازی اسپرم بر اساس شکل اسپرم اشاره کرد.^[۴]

بسیاری از محققان به بررسی و توسعه‌ی روش‌های گفته‌شده پرداخته‌اند. از جمله یانگ و همکاران به بررسی روش سانتریفیوژ گرادیان چگالی به صورت بالینی پرداخته‌اند.^[۶] فیلیپ و همکاران چهار سیستم مختلف جداسازی اسپرم توسط سانتریفیوژ برای جداساختن اسپرم را، از نظر پویایی و قابلیت زنده‌ماندن پس از فرایند جداسازی، به صورت آزمایشگاهی برای اسپرم سگ بررسی کرده‌اند.^[۷] جمیل به بررسی کارایی روش شنا کردن به سمت بالا و بازخورد آن در روش لقاح درون‌رحمی^۹ پرداخته است.^[۸] محمود و همکاران به مقایسه‌ی دو روش گرادیان چگالی و شنا رو به بالا به صورت آزمایشگاهی پرداخته‌اند.^[۹] همچنین لیو و همکاران نتایج روش‌های سانتریفیوژ چگالی و شنا کردن رو به بالا برای جداسازی اسپرم گاو میش را با انجام آزمایش مقایسه کرده‌اند. آنها اسپرم‌های جدا شده را از نظر پویایی، تمرکز اسپرم‌ها، داشتن غشای سلولی، سلامت قسمت قدامی، و داشتن کروماتین بررسی کرده‌اند.^[۱۰]

جداسازی اسپرم‌های پویا از غیر پویا جزئی اجتناب‌ناپذیر، در درمان‌های ناباروری لقاح خارج رحمی^۱ و میکرواینجکشن (تزریق اسپرم درون تخمک)^۲ است.^[۱] از آن‌جا که پویا بودن یک پارامتر مهم در تعیین کیفیت است، عملیاتی که بتواند اسپرم‌های پویا را به بهترین شکل و کمترین خطر جدا کند، برای درمان ناباروری مطلوب است.^[۴] روش جداسازی ایده‌آل باید ساده و کم هزینه باشد، تا حد امکان اسپرم‌های بیشتری را جدا کند، باعث آسیب به اسپرم یا دگرگونی فیزیولوژیکی اسپرم نشود، و اسپرم‌های مرده و دیگر سلول‌ها مثل گلبول قرمز و باکتری‌های را حذف کند. روش جداسازی مطلوب باید اجازه‌ی تحلیل مقدار بیشتری انزال برای دسترسی به اسپرم‌های بیشتر را بدهد، خطر تولید ذرات اکسیژن‌دار آماده واکنش را کم کند، و عاری از مواد سمی برای اسپرم باشد،^[۴،۳] همچنین، روش جداسازی باید به گونه‌ی باشد که در پایان فرایند انتخاب، اسپرم زنده بماند و توان باروری تخمک را داشته باشد.^[۵] روش‌های متعددی برای جداسازی اسپرم‌های پویا از نمونه‌ی سمن ارائه شده‌است؛ از این دست می‌توان

* نویسنده مسئول

تاریخ: دریافت ۱۳۹۵/۲۸/۲۸، اصلاحیه ۱۳۹۵/۴/۲۸، پذیرش ۱۳۹۵/۵/۱۹.

هیتینگ و لوناردهی بر مقایسه‌ی خود شنا به‌کنار را نیز افزوده‌اند. آن‌ها به بررسی سه روش شناکردن رو به بالا، سانتریفیوژ گزاردان چگالی، و شناکردن رو به کنار و مقایسه‌ی نتایج آزمایشگاهی آن‌ها پرداختند؛ در این پژوهش، نتایج شناکردن رو به کنارها برای لقاح درون‌سیتوپلاسمی بهتر از سایر روش‌ها ارزیابی شده‌است.^[۱۷] سانچز و همکاران از دو روش شستن به‌وسیله‌ی سانتریفیوژ و رسوبات حاصل از مهاجرت^{۱۰} برای جداسازی اسپرم، برای عملیات لقاح درون‌سیتوپلاسمی استفاده کرده‌اند و در مجموع روش دوم با وجود تعداد اسپرم تولیدی کم‌تر بهتر ارزیابی شده‌است.^[۱۲] آرزوندو و همکاران به مقایسه‌ی روش استفاده از پشم‌شیشه، با روش شناکردن رو به بالا برای جداسازی اسپرم گاو پرداخته‌اند. نتایج آن‌ها روش استفاده از پشم‌شیشه را بر روش شنا رو به بالا، از لحاظ سادگی و قیمت پایین، ترجیح می‌دهد.^[۱۳] ماگلی و همکاران به بررسی رابطه‌ی سر اسپرم با مورفولوژی اسپرم به‌صورت بالینی پرداخته‌اند.^[۱۴] چان و همکاران به توسعه‌ی روش زتا و محاسبه‌ی پارامترهای مورفولوژی، پویایی و سلامت DNA به‌صورت آزمایشگاهی پرداخته‌اند. نتایج آن‌ها رابطه‌ی معناداری بین پتانسیل زتا و میزان پویایی اسپرم نشان می‌دهد.^[۱۵] همچنین از محققان داخلی، دبمه و همکاران به بررسی نتایج جداسازی اسپرم‌ها در دو روش اتصال اسیدهیالورونیک و پتانسیل زتا به‌صورت بالینی برای ۷۰ زوج نابارور پرداخته‌اند.^[۱۶] دارابی و همکاران به بررسی اثر فعال‌سازی الکتریکی بر باروری تخمک‌ها در روش لقاح درون‌سیتوپلاسمی به‌صورت بالینی پرداخته‌اند.^[۱۷]

یکی از روش‌هایی که در سال‌های اخیر، برای جداسازی اسپرم مورد توجه قرار گرفته‌است، روش الکتروفورسیس است. اینسورث و همکاران به توسعه‌ی یک روش جداسازی اسپرم، با کمیته‌ی آسیب با روش الکتروفورسیس، و بررسی آزمایشگاهی این روش پرداختند.^[۱۸]

سایمون و همکاران طی آزمایشی ۵۰ نمونه‌ی گرفته‌شده از بیماران نابارور را تحت میدان الکتریکی قرار دادند و تأثیرات الکتروفورسیس را بر انتخاب اسپرم‌های مناسب ارزیابی کردند. نتایج آن‌ها استفاده از پتانسیل سطحی اسپرم‌ها برای جداسازی را، به دلیل سالم‌بودن و عدم آسیب به دی ان ای اسپرم، مناسب ارزیابی کرده‌است.^[۱۹] برخی از پژوهشگران به بررسی مخاطرات روش‌های جداسازی اسپرم پرداخته‌اند. در همین راستا، بیکر و ایتکن به بررسی تولید ذرات اکسیژن‌دار فعال و تأثیر منفی آن‌ها بر باروری پرداخته‌اند.^[۲۰]

در میان راه‌های مختلف برای جداسازی و سرندکردن اسپرم‌های پویاتر روش‌هایی که از میکروکانال استفاده می‌کنند، از نظر سادگی و کاربرپسندی و سازگاری با طبیعت از دیگر روش‌ها پیش افتاده‌تر هستند.^[۲۱] این زمینه، یعنی زمینه‌ی میکروسیال زمینی جدیدی از مهندسی پزشکی است که روی جریان‌های میکروسکوپی سیال تمرکز دارد.^[۲۱] میکروسیال مزایای بسیاری از جمله میزان حجم کم سیال، زمان کم انجام فرایند، و توان مورد نیاز کم را دارد.^[۲۲] به‌علاوه باتوجه به جریان‌های مورد استفاده در اعداد رینولدز پایین در ابعاد میکرو، خطوط جریان بیشتر از آن‌که آشفتگی باشند، آرام هستند.^[۲۱] درحالی‌که آشفتگی نبودن جریان، برای عملیات جداسازی و کاشت سلول بسیار مهم است.^[۲] با توجه به اهمیت سیستم‌های میکرو در این زمینه‌ی تحقیقاتی، گارسیا و همکاران به بررسی حرکت اسپرم و سیال و اثر متقابل این دو برای پیشرفت و توسعه‌ی تجهیزات میکروسیال پرداخته‌اند.^[۲۳]

فرهنگ به بررسی آزمایشگاهی عملکرد یک سیستم میکروسیال برای جداسازی اسپرم، که براساس حرکت اسپرم‌ها برخلاف جهت سیال دمیده‌شده توسعه داده شده، پرداخته‌است.^[۲۴] ماتسورا و همکاران با ساخت دو میکروکانال با ابعاد مختلف، به بررسی روش مرتب‌کردن اسپرم به‌کمک میکروسیال^{۱۱} برای عملیات لقاح درون سیتوپلاسمی به‌صورت آزمایشگاهی پرداختند.^[۲۵] سانو و همکاران از یک سیستم

مرتب‌کردن اسپرم به‌کمک میکروسیال برای جداسازی اسپرم خوک برای عملیات لقاح خارج رحمی به‌صورت آزمایشگاهی استفاده کردند.^[۲۶] در دهه‌ی اخیر چندین روش میکروسیال برای انتخاب اسپرم گزارش شده‌است. کریکا و همکاران یک وسیله در ابعاد میکرو و با کانال‌های پیچ‌درپیچ را توسعه داده‌اند.^[۲۷] اسکاتر و همکاران یک وسیله‌ی میکروسیال متشکل از دو کانال با جریان‌های آرام به‌صورت موازی را طراحی کرده‌اند که در آن اسپرم‌ها می‌توانند از یک خط جریان به خط جریان دیگر شنا کنند.^[۲۸] شیروتا و همکاران بر روی نمونه‌های گرفته‌شده از یک جامعه‌ی آماری ۳۷ نفره، دو روش جداسازی سانتریفیوژ و میکروسیال (MFSS) ارائه‌شده توسط اسکاتر و همکاران را مقایسه کردند. نتایج آن‌ها به‌صورت معناداری نشان داد جداسازی به روش میکروسیال می‌تواند سریع‌تر و بهتر از روش دیگر انجام شود.^[۲۹] چو و همکاران سیستمی معرفی کرده‌اند که با استفاده از حرکت اسپرم‌ها در جریان معکوس ایجاد شده، توسط فشار هیدروستاتیک، اسپرم‌ها را در دو خروجی ذخیره می‌کند.^[۱] خای و همکاران، با الهام‌گرفتن از دستگاه تناسلی جنس ماده، سیستم میکروسیالی متشکل از سه کانال (یک کانال ورودی و دو کانال خروجی) ارائه داده و طول و عرض کانال‌ها را بهینه کرده‌اند.^[۲] نولتون و همکاران طی پژوهشی سیستم‌های میکروسیال مورد استفاده در جداسازی اسپرم را بررسی کردند.^[۳] از جمله سیستم‌هایی که آن‌ها بررسی کرده‌اند، می‌توان به استفاده از گزاردان دما و سیستم چندکاناله‌ی میکروسیالی ارائه‌شده توسط سئو و همکاران اشاره کرد.

در زمینه‌ی شبیه‌سازی حرکت اسپرم در سیال پژوهش‌های بسیار کمی صورت گرفته‌است. ایشیموتو و همکاران هیدرودینامیک حرکت اسپرم ماهی به سمت سلول تخم را به‌صورت عددی شبیه‌سازی کردند. نتایج آنان اختلاف معناداری بین مشاهدات تجربی و شبیه‌سازی‌ها نشان می‌دهد. بر اساس شبیه‌سازی‌های ایشیموتو و همکاران حرکت اسپرم در سطح صاف پایدار است؛ درحالی‌که اسپرم در مواجهه با سلول تخم دچار ناپایداری می‌شود.^[۳۱]

سئو و همکارانش سیستمی^{۱۲} طراحی کرده‌اند که از چهار کانال و سه مخزن تشکیل شده‌است. سیستم سئو و همکاران نسبت به دیگر سیستم‌های ارائه‌شده دارای مزایایی است. از جمله این‌که با داشتن حداکثر یک مرتبه سانتریفیوژ، دارای کمترین خطر برای تولید اکسیژن فعال است. ضمناً این سیستم به هیچ وجه سمی نیست. در این طراحی جریان موجود در کانال‌ها با استفاده از فشار هیدروستاتیک ناشی از ارتفاع سیال در مخازن، ایجاد می‌شود و با ایجاد یک جریان معکوس در کانال اصلی، فقط به اسپرم‌های پویا اجازه‌ی شنا در خلاف جهت جریان داده می‌شود و سایر ترکیبات سمن اجازه‌ی همراهی اسپرم را نمی‌یابند. در این سیستم به‌خوبی می‌توان سرعت سیال را در کانال‌ها کنترل کرد. همچنین طراحی چندگانه و چندکاناله‌ی آن امکان کار با اختلاف فشار (ارتفاع) بیشتری را بین مخازن می‌دهد که موجب استفاده‌ی آسان‌تر از این وسیله در کلینیک‌ها می‌شود. همچنین، عدم نیاز به پمپ برای ایجاد جریان معکوس از دیگر مزایای کار سئو و همکاران است.^[۳۲]

یکی از مشکلات سیستم ارائه‌شده توسط سئو و همکاران که موجب شده‌است این سیستم جایگاه مناسبی در آزمایشگاه‌ها پیدا نکند، انتخاب تعداد نسبتاً کم اسپرم است. پژوهش حاضر به دنبال رفع این نقص است. همچنین مدل‌سازی پدیده‌ها با نرم‌افزار می‌تواند از آزمایش‌های متعدد برای یافتن طول بهینه بکاهد. در این پژوهش به شبیه‌سازی سیستم طراحی‌شده توسط سئو پرداخته خواهد شد. همچنین نتایج با نتایج سئو تطبیق داده خواهد شد و در نهایت اندازه‌ی میکروکانال‌های مناسب انتخاب خواهد شد. مدل‌ها به وسیله‌ی نرم‌افزار گمبیت^{۱۳} طراحی و به وسیله‌ی

و طول کانال خروجی (متصل به مخزن ۳) L_3 و ضخامت این دو کانال به ترتیب $2a_2$ و $2a_1$ نامیده می‌شوند. مخازن به ترتیب P_1 (مخزن ورودی جریان)، P_2 (مخزن ورودی اسپرم) و P_3 (مخزن خروجی اسپرم) نام گرفته‌اند. بنابراین، اختلاف ارتفاع مخزن ۱ و ۲، Δh_1 و اختلاف ارتفاع مخزن ۲ و ۳، Δh_2 در نظر گرفته می‌شود.

۳. فرضیات، شرایط مرزی

به منظور سادگی حل معادلات، فرضیاتی در نظر گرفته شده است که به آن‌ها اشاره می‌شود.

جریان داخل کانال‌ها دائم، آرام، و تراکم‌ناپذیر است. جریان در دو حالت پایا و گذار بررسی شد و نتیجه‌ی برابر به دست آمد. به همین دلیل در کل تحلیل‌ها، به علت سرعت کم انجام فرایند حالت پایا در نظر گرفته می‌شود. جریان حاصل، جریان دو فاز مایع - جامد در میکروکانال و در اعداد رینولدز پایین است. از پارامترهایی نظیر اثر نه‌نشینی ذرات و اثر سطوح دیواره‌ها بر روی ذرات پراکنده صرف نظر شده است. مدل برای انتقال آب به صورت تک‌فاز در نظر گرفته شده است. از تأثیر گرانش صرف نظر می‌شود. شرط عدم لغزش در دیواره‌ی کانال‌ها صادق است و جریان به صورت بدون لغزش در نظر گرفته می‌شود.

برای تمام ورودی‌ها و خروجی‌های جریان در کانال‌ها، شرط مرزی جریان توسعه یافته و برای دیواره‌های کناری فرض عدم لغزش در نظر گرفته شده است. به منظور بررسی صادق بودن شرط عدم لغزش از نمودار موجود استفاده کرده‌ایم.^[۲۸] طبق این نمودار برای میکروکانال‌های با ضخامت بیش از ۹ میکرومتر جریان در رژیم غیر لغزشی و پیوسته قرار می‌گیرد. با توجه به ابعاد کوچک مدل، جریان در کانال‌های مورد بررسی در ناحیه‌ی پیوسته و بدون لغزش جای می‌گیرد. بنابراین در حل نرم‌افزاری از معادلات ناویر - استوکس استفاده می‌شود.^[۲۸]

در مدل‌سازی و شبیه‌سازی سیستم حاضر، دو راه حل پیش روست:

الف) در تمام تحلیل‌ها اسپرم در کانال‌ها و حرکت آن و ارتباط بافت آن با سیال به صورت کامل مدل شود.

ب) در حل مسئله از روش جمع آثار استفاده شود. به این ترتیب که با توجه به پژوهش‌های گذشته سرعت حرکت اسپرم، در سرعت‌های مختلف سیال مشخص است. همچنین، بنابر پژوهش‌های صورت گرفته ۸۰ درصد از اسپرم‌ها تمایل دارند در خلاف جهت سیال حرکت کنند. بنابراین، با محاسبه‌ی سرعت حالت دائم سیال در کانال سرعت اسپرم در کانال مشخص است. حال با لحاظ کردن سرعت سیال و سرعت مشخص اسپرم و در دست داشتن سایر اجزای مرده و ساکن همراه با اسپرم می‌توان آینده‌ی آزمایش را با قطعیت قابل قبولی تعیین کرد.

از جمله تحقیقات اندکی که در مورد شبیه‌سازی عددی حرکت اسپرم در سیال صورت پذیرفته است، پژوهش ایشیموتو و همکاران است. مطابق با نتایج آن‌ها اختلاف زیادی بین نتایج شبیه‌سازی حرکت اسپرم در سیال با مشاهدات تجربی وجود دارد.^[۳۱] حال اگر این شبیه‌سازی را بخواهیم در تمام تحلیل‌ها استفاده کنیم علاوه بر خطاهای زیاد در نتایج نهایی، زمان حل نیز به هیچ وجه به صرفه نخواهد بود و نتایج نهایی فاقد اعتبار لازم خواهند بود.

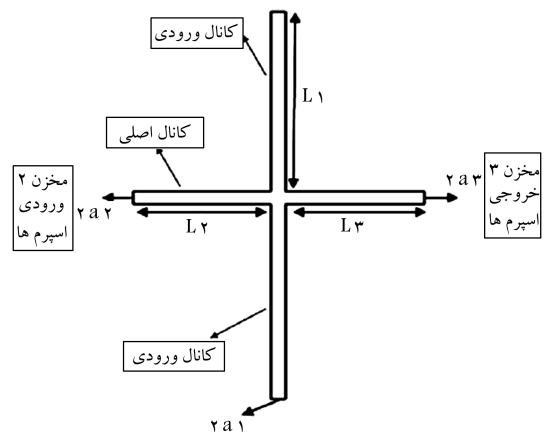
بنابراین برای طراحی بهینه‌ی ابعاد کانال‌ها استفاده از روش الف) به روش ب) ترجیح داده شد.

نرم‌افزار فلونت^{۱۴} تحلیل خواهند شد. در پژوهش حاضر در مقایسه با پژوهش ستو، از شبیه‌سازی نرم‌افزاری و در بخش انتخاب طول مناسب کانال‌ها از سرعت اسپرم‌های غیر پویا استفاده شده است. در نتیجه‌ی این کار، طول کانال اصلی کوتاه‌تر می‌شود و همچنین سرعت فرایند افزایش می‌یابد. همچنین در این کار در مقایسه با کار ستو و همکاران علاوه بر سایر کانال‌ها طول مناسب برای کانال اصلی انتخاب خواهد شد. زیرا طول زیاد کانال اصلی موجب خستگی اسپرم‌ها و جداسازی اسپرم‌هایی با توان باروری کم‌تر می‌شود.

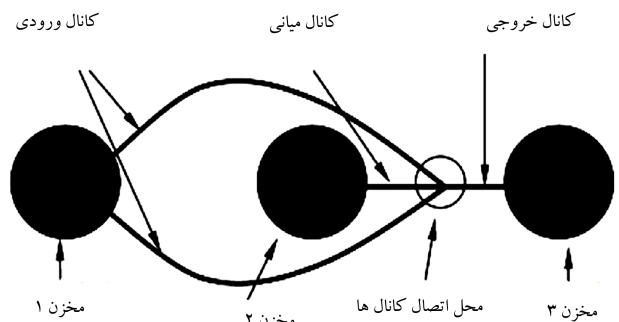
در پژوهش حاضر علاوه بر ارتقای سیستم ستو و همکاران، برای جداسازی اسپرم‌ها، روشی نوین و سازگار با ویژگی‌های اسپرم بر اساس پتانسیل سطحی زتا و الکتروفورسیس ارائه خواهد شد.

۲. هندسه و دامنه‌ی مدل‌سازی

طرح مورد بحث از سه مخزن و چهار کانال تشکیل شده است. طول، عرض، و ضخامت مخازن در طول کار به صورت بهینه طراحی خواهند شد. در طراحی و تحلیل‌های صورت گرفته دو طرح نشان داده شده در شکل‌های ۱ و ۲. به دلیل روبرو بودن با جریان آرام با مدل‌سازی و تحلیل در دو حالت نتایج یکسانی مشاهده شده است؛ بنابراین، در طول مدل‌سازی‌ها به علت سادگی از شکل ۲ کمک گرفته شده است. طول کانال اصلی L_2 ، عرض کانال اصلی a_2 ، و ضخامت کانال‌ها مطابق با سیستم طراحی شده توسط ستو و همکاران ۲۵ میکرومتر در نظر گرفته می‌شود. همچنین طول کانال فرعی ورودی L_1 (متصل به مخزن ۱)



شکل ۱. طرح مدل شده برای کانال‌های جداسازی.



شکل ۲. طرح مدل شده دوم برای کانال‌های جداسازی (طرح کانال پیشنهادی ستو و همکاران ۲۰۰۷).^[۱]

۴. مدل‌سازی، بحث و نتیجه‌گیری

۱.۴. نتایج شبیه‌سازی سئو و همکاران

با توجه به نتایج سئو و همکاران در پایان‌نامه‌ی جداسازی اسپرم نتایج زیر قابل دستیابی است: [۳۲]

نویسنده با استفاده از چند پروفیل سرعت در کانال‌هایی با ضخامت ثابت، در پایان‌نامه‌ی خود نشان می‌دهد که ضخامت (عمق مجرای) $25 \mu\text{m}$ می‌تواند سرعت مورد نظر را برای جداسازی اسپرم ایجاد کند. او نشان می‌دهد که اولاً با کاهش طول کانال ورودی (کانال ۱) سرعت معکوس در کانال اصلی افزایش می‌یابد و در طول L_1 حدود 23 میلی‌متر می‌توان به سرعت مورد نظر رسید. همچنین Δh_2 بهینه برای رسیدن به سرعت مورد نظر در کانال اصلی، 2 میلی‌متر است. سئو نشان می‌دهد که نسبت اختلاف فشارها و همچنین Δh_2 بر سرعت کانال اصلی تأثیرگذار است و از آن نتیجه می‌گیرد که مقدار Δh_2 بهینه در حدود 2 میلی‌متر مناسب است و بهتر است بیشتر از 1 میلی‌متر باشد.

۲.۴. انتخاب ابعاد مناسب برای کانال‌ها

مزیت پژوهش حاضر نسبت به کار مشابه، آن است که حداقل کردن طول کانال 2 برای دستیابی به سرعتی مجاز معیار بهینه‌کردن قرار داده شده است و برای شبکه‌بندی از گمبیت و برای شبیه‌سازی جریان سیال از فلوئنت کمک گرفته شده است. زیرا اولاً طول زیاد کانال 2 (کانال اصلی) سبب خسته‌شدن اسپرم‌ها و پایین آمدن پویایی می‌شود. ثانیاً اگر سرعت سیال زیاد باشد اسپرم‌ها نمی‌توانند مسیر را طی کنند. [۱] برای بهینه‌کردن طول کانال 2 (کانال اصلی)، لازم است سرعت اسپرم‌های پویا و غیر پویا تعیین شود. با استفاده از نمودار $5-16$ [۳۲] و شکل 13 [۱] در پژوهش‌های انجام شده، و با انجام محاسبات ریاضی و کم‌کردن سرعت سیال از سرعت اسپرم‌ها و همچنین میانگین‌گرفتن بین سرعت اسپرم‌های مختلف و با لحاظ ضرایب اطمینان، سرعت اسپرم غیر پویا $18 \mu\text{m/s}$ به دست آمد. همچنین محققان [۱] بر اساس مشاهدات تجربی، سرعت اسپرم پویا را $70 \mu\text{m/s}$ محاسبه کردند. [۳۲] در ادامه، کانال‌ها در نرم‌افزار گمبیت مدل شد و پس از تحلیل و شبیه‌سازی نتایجی با هدف بهتر کردن ابعاد کانال‌ها بر اساس معیارهای پیشین حاصل شد، که در شکل 3 قابل مشاهده است. شکل 3 ، تغییرات سرعت بر اساس تغییر در اندازه‌ی طول کانال اصلی و Δh_1 را نشان می‌دهد. هدف از پژوهش حاضر بهتر کردن طول کانال اصلی برای سهولت در رسیدن اسپرم‌ها و ایجاد سرعت مورد نظر برای جلوگیری از حضور

اسپرم‌های غیر پویا در مخزن نهایی است. در تحلیل صورت‌گرفته (شکل 3)، Δh_2 ، برابر 2 میلی‌متر است. سایر اطلاعات مربوط به هندسه‌ی کانال‌ها در جدول 1 آمده است.

از جمله مزایای پژوهش حاضر این است که معیار طول مناسب کانال‌ها را سرعت اسپرم‌های غیر پویا قرار داده است. زیرا هدف حذف این اسپرم‌های ناکارآمد و انتخاب تعداد بیشتر اسپرم است؛ درحالی‌که سئو و همکاران در کار مشابه معیار جداسازی را سرعت اسپرم‌های پویا و در حدود 70 میکرومتر بر ثانیه در نظر گرفتند. بر اساس نتایج حاصل‌شده از شکل 3 ، در حالتی که طول کانال اصلی (کانال 2)، 5 میلی‌متر باشد امکان رسیدن به سرعت $18 \mu\text{m/s}$ تا $20 \mu\text{m/s}$ وجود دارد. ضمن آن‌که این اتفاق در فشار کمتری هم صورت می‌گیرد و مطابق با محدودیت‌هایی که سئو و همکاران لحاظ نموده‌اند، این طول بزرگ‌تر از 4 mm نیز هست. [۳۲] بنابراین، طول مناسب برای کانال اصلی 5 میلی‌متر در نظر گرفته خواهد شد.

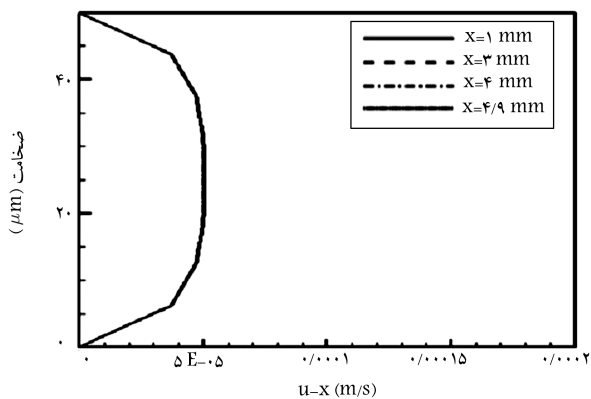
شکل 4 جریان در کانال اصلی به طول 5 میلی‌متر را نشان می‌دهد. بر اساس این شکل، تقریباً در سراسر کانال و در مقاطع مختلف، یک پروفیل سرعت ثابت برقرار است و پروفیل‌های سرعت در مقاطع مختلف در طول کانال در یک جریان خاص بر هم منطبق هستند. علاوه بر این، قسمت عمده‌ی از عرض میکروکانال (قسمت میانی) دارای سرعتی نزدیک به هم است. که برای تحلیل از سرعت بیشینه در مقطع $x = 4/9 \text{ mm}$ در نمودارها استفاده می‌شود.

۳.۴. تطبیق نتایج

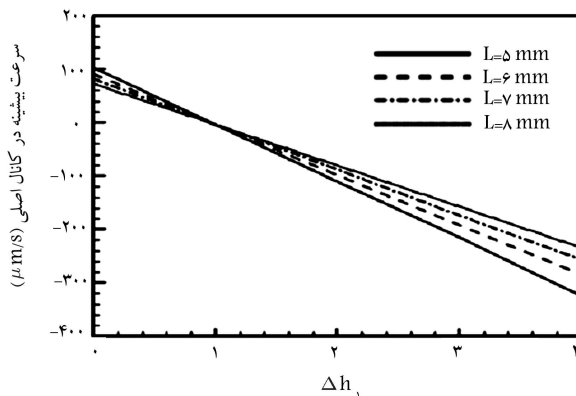
شکل 5 مطابقت قابل قبولی را بین نتایج مدل‌سازی پژوهش حاضر برای $\Delta h_2 = 2/29 \text{ mm}$ ، با نتایج عددی سئو و همکاران نشان می‌دهد. همچنین شکل 6 مطابقت نتایج این پژوهش در $\Delta h_2 = 3/43 \text{ mm}$ را، با کار سئو و همکاران

جدول ۱. اطلاعات کانال‌ها.

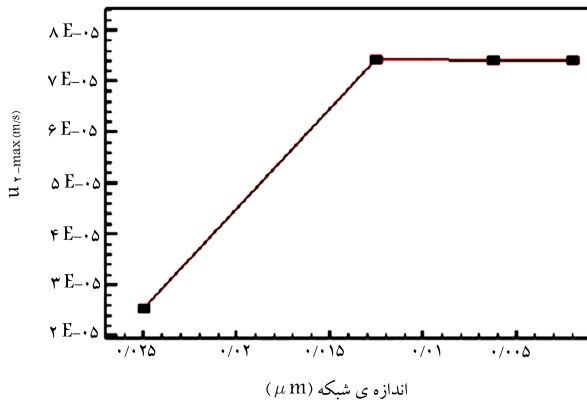
کانال‌ها	طول کانال (mm)	عرض کانال (μm)	ضخامت (μm)
کانال ورودی	۲۳	۱۰۰	۲۵
کانال اصلی	۵	۵۰	۲۵
کانال خروجی	۵٫۵	۵۰	۲۵



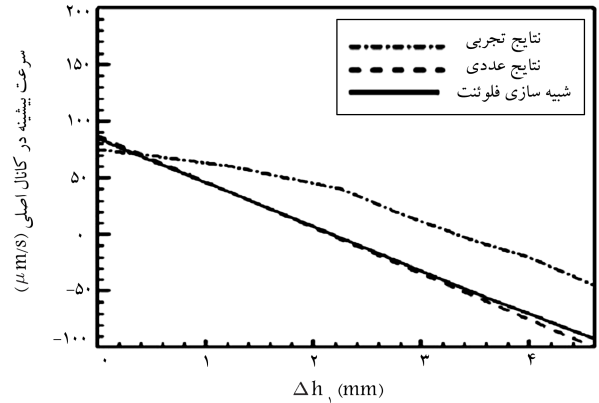
شکل ۴. نمودار پروفیل مؤلفه‌ی سرعت در راستای طول کانال در مقاطع مختلف.



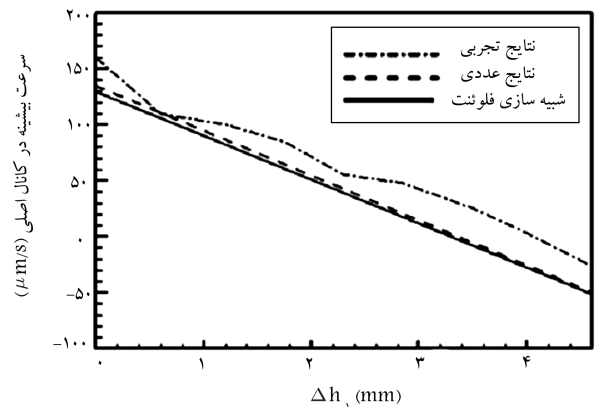
شکل ۳. تأثیر طول کانال اصلی بر سرعت بیشینه در کانال اصلی.



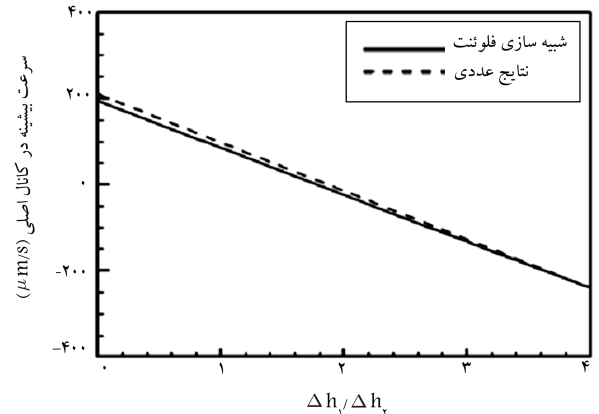
شکل ۸. سرعت بیشینه در کانال اصلی بر حسب اندازه‌ی شبکه.



شکل ۵. نمودار مطابقت نتایج سرعت بر حسب اختلاف فشار مخازن ۱ و ۲.



شکل ۶. نمودار مطابقت نتایج سرعت بر حسب اختلاف فشار مخازن ۱ و ۲.



شکل ۷. نمودار مطابقت نتایج سرعت بر حسب نسبت اختلاف فشار مخازن.

۵. ارائه‌ی سیستم میکروسیال نوین برای جداسازی اسپرم

۱.۵. ویژگی‌های اسپرم

یک اسپرم معمولی دارای جرم $10^{-14} \times 22$ کیلوگرم است و دارای شارژ الکتریکی سطحی زتای ۱۶- تا ۲۰- میلی‌ولت می‌باشد. [۳۳، ۱۵]

پویایی متفاوت و نسبت شارژ الکتریکی به سطح متفاوت سلول‌ها در میدان الکتریکی به سلول‌ها امکان جداسازی می‌دهد.

پویایی الکتریکی یک سلول اسپرم، ارتباط مستقیمی با چگالی شارژ منفی سطح سلول اسپرم دارد. شارژ سطحی سلول‌ها، به نوع سلول، تازگی سلول، و PH سیال استفاده‌شده برای جداسازی بستگی دارد. در PH طبیعی بدن، سلول‌های اسپرم دارای شارژ سطحی خالص منفی هستند و هنگامی که در یک میدان الکتریکی قرار می‌گیرند، به سمت قطب (الکتروود) آند حرکت می‌کنند. [۳۴]

۲.۵. الکتروفوریتیک

به حرکت ذره‌ی باردار درون سیال نسبت به مایعی که در آن معلق است تحت شرایط اعمال یک میدان الکتریکی خارجی، اثر الکتروفوریتیک گفته می‌شود. زمانی که میدان الکتریکی در سراسر یک الکترولیت اعمال می‌شود، ذرات باردار معلق درون الکترولیت جذب الکتروود با بار مخالف می‌شوند. در این زمان، نیروهایی در برابر این جابه‌جایی مقاومت می‌کنند و با حرکت ذرات باردار مخالفت می‌کنند. وقتی بین نیروی جابه‌جایی ذرات و نیروی مخالف حرکت ذرات تعادل برقرار شود، ذرات با سرعت ثابتی درون الکترولیت حرکت می‌کنند. به سرعت حرکت ذرات در یک میدان الکتریکی، اصطلاحاً تحرک الکتروفوریتیک گفته می‌شود. [۳۵]

این حرکت ذرات درون الکترولیت به فاکتورهایی وابسته است که عبارت‌اند از:

-- میدان الکتریکی اعمال‌شده؛

-- ثابت دی‌الکتریک الکترولیت؛

-- ویسکوزیته‌ی الکترولیت؛

-- پتانسیل زتای ذرات. [۳۵]

با این پیش فرض می‌توان تحرک الکتروفوریتیک (سرعت) ذرات را، به‌وسیله‌ی

نشان می‌دهد. ضمناً در شکل ۷ نتایج مدل‌سازی این پژوهش با نتایج سئو برای $\Delta h_2 = 2 \text{ mm}$ تطبیق داده شده است. [۳۲]

در مدل‌سازی مسئله از شبکه‌های مربعی استفاده شده است. به‌منظور اطمینان از نتایج آنالیز عددی، عدم وابستگی نتایج به شبکه بررسی شد. به‌همین منظور نمودار سرعت بیشینه در کانال اصلی بر اساس ابعاد شبکه ترسیم شده است. مطابق نمودار شکل ۸، از نقطه‌ی دوم با تعداد سلول ۱۳۵۲۹۶ (فاصله‌ی گره‌ها کمتر از 0.0125 میلی‌متر) به بعد سرعت نقطه‌ی مورد نظر به تعداد شبکه وابسته نیست.

معادله‌ی هنری^[۲۸] (معادلات ۱ و ۲) به دست آورد.

$$u_{EP} = \frac{2}{3} \frac{\epsilon z E}{\mu} \quad (۱)$$

که در آن، ϵ ثابت دی‌الکتریک؛ Z پتانسیل زتا؛ E میدان الکترواستاتیک در واحد فاصله‌ی میدانی؛ μ ویسکوزیته‌ی سیال است.

$$E = -\nabla\varphi \quad (۲)$$

$\nabla\varphi$ اختلاف پتانسیل دوسر الکترودها است. ارائه‌ی روشی که بتواند اسپرمی با بهترین خواص و با رعایت ویژگی‌های گفته‌شده برای روش جداسازی ایده‌آل را انتخاب کند، در کانون توجه محققان این زمینه قرار دارد. روش‌هایی که تاکنون ارائه شده‌اند به نحوی ناقص هستند و جوابگوی تمام ویژگی‌های اسپرم نیستند.

یک سلول اسپرم مناسب به علت داشتن دم کامل و سالم قادر به شنا کردن در خلاف جهت سیال به نحو مطلوب است.^[۲۴] همچنین یک اسپرم مناسب و دارای مورفولوژی خوب دارای بار الکتریکی و شارژ الکتریکی مناسبی در ناحیه‌ی سر خود است.^[۲۴]

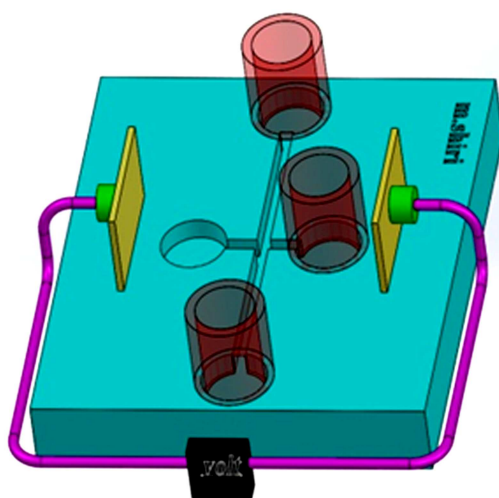
روشی که از تجمع جداسازی اسپرم با نظر بر جداسازی از منظر میکروسیالی و شنا کردن مناسب، و جداسازی از منظر بار الکتریکی سر بیشتر به دست آید، می‌تواند پیشرفت قابل توجهی در زمینه‌ی جداسازی اسپرم به لحاظ کیفی داشته باشد.

۳.۵ تشریح روش نوین جداسازی

در این بخش به ارائه‌ی یک سیستم الکترومکانیکی در ابعاد میکرو^{۱۶} خواهیم پرداخت. این سیستم در واقع بین روش جداسازی الکتروفورسیس آیتکن و سیستم سو^{۱۷} تجمع برقرار کرده است.

این وسیله از یک سیستم چند کاناله (TRMS)^{۱۸} و یک میدان الکترواستاتیک که به وسیله‌ی الکترودهای موجود در دو سمت آن ایجاد می‌شود از سه مخزن، دو الکترو، کانکتور، سیم، و یک منبع تغذیه تشکیل شده است. در شکل ۹ سیستم جدید نشان داده شده است.

با تعادلی که بین سه مخزن ۱، ۲ و ۳ برقرار می‌شود یک جریان معکوس در کانال شماره ۲ ایجاد می‌شود. اسپرم‌های موجود در مخزن ۲ سعی می‌کنند در



شکل ۹. سیستم نوین جداسازی اسپرم پویا.

خلاف جهت جریان در کانال ۲ شنا کنند و با میدان الکترواستاتیک با اندازه‌ی ثابت ایجادشده در دوسر TRMS همراه می‌شوند. با توجه به پتانسیل زتا منفی سطح سلول‌های اسپرم، با ایجاد اختلاف پتانسیل مناسب، اسپرم‌های با بار بیشتر سرعت ثابت بیشتری نسبت به سایر سلول‌های اسپرم را دارا خواهند بود. بنابراین، با ایجاد تعادل مناسب بین پتانسیل دو سر الکترودها و سرعت جریان معکوس سیال در کانال ۲ یک سیستم جداساز متناسب با اکثر ویژگی‌های اسپرم پویا حاصل خواهد شد.

۴.۵ محاسبات و بهینه‌سازی سیستم

یک سلول اسپرم دارای شارژ الکتریکی ۱۶- تا ۲۰- میلی‌ولت است. سیالی که در سیستم پیشنهادشده‌ی حاضر، از آن استفاده می‌کنیم، PBS^{۱۹} نام دارد، که در دمای معمول اتاق دارای لزجت ۰.۹۳۳ mPa.s است.^[۲۷،۲۶]

برای محاسبه‌ی سرعت الکتروفورز اسپرم در اثر اعمال میدان ثابت از رابطه‌ی ۱ استفاده می‌شود. در این رابطه ϵ ثابت دی‌الکتریک سیال PBS است. ϵ در واقع یک عدد مختلط است که مطابق رابطه‌ی ۳ از دو قسمت حقیقی و موهومی تشکیل شده است.

$$\epsilon = \epsilon' - J\epsilon'' \quad (۳)$$

در واقع با قسمت حقیقی ثابت دی‌الکتریک، یعنی ϵ' سر و کار داریم. از سوی دیگر در منابع مختلف معمولاً ثابت دی‌الکتریک را به عنوان یک پارامتر نسبی (ϵ_R) نسبت به ثابت دی‌الکتریک خلأ (ϵ_0) بیان می‌کنند. رابطه‌ی ۴ ثابت نسبی را بیان می‌کند.

$$\epsilon_R = \frac{\epsilon'}{\epsilon_0} \quad (۴)$$

با توجه به روابط ۳ و ۴ ثابت مورد نظر را می‌توان از رابطه‌ی ۵ محاسبه کرد.^[۲۸،۲۹]

$$\epsilon' = \epsilon_R \epsilon_0 \quad (۵)$$

ϵ_R برای PBS برابر ۷۷٫۰ است و این مقدار در محاسبات استفاده خواهد شد.^[۲۰] از سوی دیگر مقدار ϵ_0 برابر $8.85 \times 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$ لحاظ خواهد شد.^[۲۸]

برای طراحی سیستم الکترومکانیکی از TRMS بهینه‌شده در بخش سوم استفاده می‌شود که مقادیر اندازه‌های مربوط به ابعاد آن در جدول ۲ آمده است.

اختلاف پتانسیل اعمالی به دوسر الکترودها، بنابر کاربری مورد نظر می‌تواند متفاوت باشد. مثلاً اگر اختلاف پتانسیل ۱۱۰ ولت به دوسر الکترودها اعمال شود و فاصله‌ی بین الکترودها ۱۰/۵ میلی‌متر باشد سرعت حرکت اسپرم پویا با پتانسیل الکتریکی حداکثر ۱۰۰ میکرومتر بر ثانیه افزایش می‌یابد.

به این ترتیب در سیستم نوین جداساز اسپرم به راحتی با داشتن اندازه‌ی میدان اعمالی می‌توان زمان فرایند را نیز کنترل کرد. یعنی هر قدر اختلاف پتانسیل دو الکترو بیشتر باشد سرعت جداسازی اسپرم‌ها و سرعت حرکت آن‌ها در سیال افزایش

جدول ۲. ابعاد مربوط به TRMS بهینه‌شده.

کانال‌ها	طول کانال (mm)	عرض کانال (μm)	ضخامت (μm)
کانال ورودی	۲۳	۱۰۰	۲۵
کانال اصلی	۵	۵۰	۲۵
کانال خروجی	۵/۵	۵۰	۲۵

به علاوه، سرعت معکوس کمتر کانال اصلی با توجه به انتخاب سرعت اسپرم غیر پویا به عنوان معیار جداسازی، موجب افزایش اسپرم های قابل استفاده در فرایند باروری خواهد شد.

در این پژوهش سعی شد یک سیستم نسبتاً جامع برای جداسازی، انتخاب، و پالایش اسپرم ارائه شود. این سیستم بر مبنای دو سیستم ستو و همکاران و روش الکتروفورسیس و البته با نگاهی علمی به مبحث پتانسیل زتا در جریان های میکرو و نانو ارائه شد. با استفاده از نرم افزار فلونت تحلیل سازی و تحلیل شد، و ابعاد مناسب برای این سیستم به دست آمد.

-- سیستم حاضر، تجربیات روش های جداسازی زتا، الکتروفورسیس، و روش های میکروسایالی همچون TRMS را تجمیع کرده و دارای جامعیت مناسبی در این زمینه است.

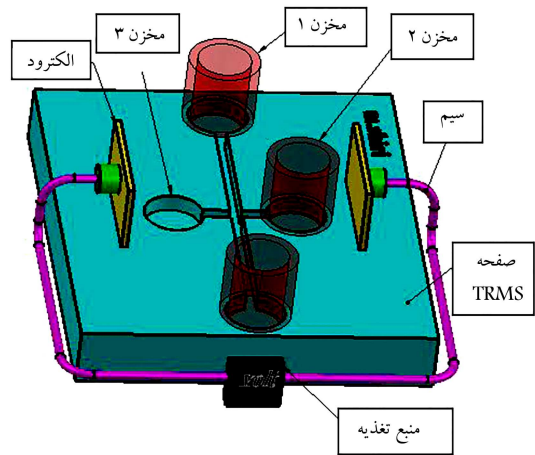
-- در این سیستم علاوه بر لحاظ قابلیت های مورفولوژی و استفاده از معیار سرعت اسپرم غیر پویا برای تجمیع بیشتر اسپرم ها، با اعمال میدان الکترواستاتیک که موجب افزایش سرعت فرایند جدایش می شود، اسپرم هایی با سرهای با بار الکتریکی بیشتر و به عبارت دیگر پویاتر جدا می شود.

-- کنترل سیستم به صورت دیجیتالی بسیار آسان تر از سیستم های هیدرواستاتیکی است و این نکته قابلیت تجاری شدن و کاربرد پسندهی این سیستم را افزایش می دهد.

-- این سیستم به علت هدایت اسپرم ها در یک کانال مستقیم امکان اتصال سیستم به سیستم های جدایش و برش فلوسیتومتری را افزایش می دهد.

سیستم ارائه شده در این پژوهش ساده و کم هزینه است و با اعمال معیار جدایش طبق سرعت اسپرم غیر پویا تا حد امکان اسپرم های بیشتری را جدا می کند. باعث آسیب به اسپرم یا دگرگونی فیزیولوژیکی آن نمی شود، اسپرم های مرده و دیگر سلول ها مثل گلبول قرمز و باکتری های را حذف می کند، اجازه ی تحلیل مقدار بیشتری انزال برای دسترسی به اسپرم های بیشتر را می دهد، خطر تولید ذرات اکسیژن دار آماده و واکنش در آن تقریباً وجود ندارد، و عاری از مواد سمی برای اسپرم است؛ به علاوه، روش جداسازی به گونه ایی است که در پایان فرایند انتخاب اسپرم زنده می ماند و دچار خستگی کمتری می شود و توان باروری تخم را دارد. به طور کلی این سیستم سعی کرده است خود را به معیارهای جداسازی ایده آل نزدیک کند.

از اختراع حاضر می توان در درمان ناباروری به روش های IVF و ICSI و IUI، برای اصلاح نژاد پستانداران، تعیین جنسیت اسپرم بر اساس بار الکتریکی (زیرا اسپرم های ناقل ژن دختر و پسر دارای بارهای نابرابری هستند)، همچنین در باروری سالم والدین ناقل ایدز استفاده کرد.



شکل ۱۰. طرح واره ی کلی سیستم نوین جداسازی و معرفی اجزا.

می یابد و در ضمن از خستگی اسپرم ها کاسته خواهد شد. سیستم نوین شامل یک مجموعه کانال TRMS، سه مخزن، دو الکتروود، کانکتور، سیم و یک منبع تغذیه است. شکل ۱۰ طرح واره یی از سیستم نوین جداسازی را نشان می دهد.

۶. نتیجه گیری

برای جداسازی اسپرم های پویا از غیر پویا سیستم طراحی شده توسط ستو و همکاران معرفی شد. در این طرح از فشار هیدرواستاتیک استفاده شده است. در پژوهش حاضر، مدل چهار کاناله ای این سیستم به وسیله ی نرم افزار گمبیت و با شبکه های مربعی مدل سازی و به وسیله ی نرم افزار فلونت تحلیل شد. با تطابق نتایج با نتایج توری و آزمایشگاهی ستو و همکاران، تعداد دفعات آزمایش بالینی برای بهینه سازی کانال ها کاهش یافت. مزیت استفاده از ستون های آب به عنوان مولد اختلاف فشار و چندکاناله بودن، استفاده ی آسان و عدم نیاز به پمپ در آزمایشگاه هاست. در این پژوهش سرعت اسپرم های غیر پویا، معیار انتخاب طول مناسب برای این سیستم قرار گرفت، در حالی که ستو و همکاران معیار انتخاب طول مناسب را سرعت پیشینه در کانال اصلی در نظر گرفته بودند که موجب خستگی و کاهش بازدهی اسپرم می شد. سرعت اسپرم های غیر پویا ۱۸ تا ۲۰ میکرومتر بر ثانیه محاسبه شد. بر اساس محاسبات ستو و همکاران اندازه ی کانال اصلی باید بیشتر از ۴ میلی متر باشد و مطابق با شکل ۲ طول مناسب کانال اصلی ۵ میلی متر به دست آمد. کاهش طول از ۸ به ۵ میلی متر موجب حفظ پویایی و افزایش سرعت جداسازی خواهد شد.

پانویس ها

1. IVF
2. ICSI
3. Sperm washing
4. Sperm migration
5. Sperm sedimentation
6. Filtration

7. density gradient centrifugation
8. MACS
9. IUI
10. migration-sedimentation
11. MFSS
12. MSMS
13. Gambit
14. Fluent
15. Henri

16. MEMS
17. TRMS
18. three reservoirs microfluidic system
19. phosphat bffer salin

منابع (References)

1. Seo, D.B., Agca, Y. and Feng, Z.C. "Development of sorting, aligning, and orienting motile sperm using microfluidic device operated by hydrostatic pressure", *Microfluid Nanofluid*, **3**, pp. 561-570 (2007).
2. Xie, L., Ma, R., Han, C., Su, K. and Zhang, Q. "Integration of sperm motility and chemo taxis screening with a micro channel-based device", *Clinical Chemistry*, **56**(8), pp. 1270-1278 (August 2010).
3. Centola, G.M., Herko, R., Andolina, E. and Weisensel, S. "Comparison of sperm separation methods: Effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation", *Fertil Steril*, **70**(6), pp. 1173-1175 (1998).
4. Ortega, N.M. and Bosch, P., *Methods for Sperm Selection for In Vitro Fertilization*, Chapter 4, In Vitro Fertilization-Innovative clinical and Laboratory Aspects, pp. 71-86 (2003).
<http://www.intechopen.com/books>.
5. Hassan, D.A. "Separation techniques for X and Y chromosome bearing human spermatozoa", in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Magister Technologia Biomedical Technology, Department of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences Tshwane University of Technology (2005).
6. Yung, C.T., Mike, Y.L., Sheng, H.C., Chieh, Y.K., Yi, T.T., Loo, T.C., Liang, Y.L. and Kuo, F.H. "Comparing the clinical outcomes of intrauterine insemination by two different density gradient preparation methods", *J Chin Med Assoc*, **67**, pp. 168-171 (2004).
7. Phillips, T.C., Dhaliwal, G.K., Verstegen-Onclin, K.M. and Verstegen, J.P. "Efficacy of four density gradient separation media to remove erythrocytes and nonviable sperm from canine semen", *Theriogenology*, **77**(1), pp. 39-45 (1 January 2012).
8. Jameel, T. "Sperm swim-up: A simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination", *J Pak Med Assoc*, **58**(2), pp. 71-4 (February 2008).
9. Mehmood, A., Anwar, M. and Naqvi, S.M. "Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen", *Animal Reproduction Science*, **111**, pp. 141-148 (2009).
10. Ben, L., Yan, C. and Si, J.Y. "Effect of swim-up and percoll treatment on sperm quality and in vitro embryo development in yak", *Journal of Integrative Agriculture*, **12**(12), pp. 2235-2242 (December 2013).
11. Hinting, A. and Lunardhi, H. "Better sperm selection for intra cytoplasmic sperm injection with the side migration technique", *Andrologia*, **33**, pp. 343-346 (2001).
12. Sanchez, R., Stale, T., Khanaga, O., Turley, H., Gips, H. and Schill, W.B. "Sperm selection methods for intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) in andrological patients", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **13**(3), pp. 228-233 (1996).
13. Arzondo, M.M., Caballero, J.N., Marin-Briggiler, C.I., Dalvit, G., Cetica, P.D. and Vazquez-Levin, M.H. "Glass wool filtration of bull cryopreserved semen: A rapid and effective method to obtain a high percentage of functional sperm Original Research Article", *Theriogenology*, **78**(1), pp. 201-209 (1 July 2012).
14. Magli, M.C., Crippa, A., Muzii, L., Boudjema, E., Capotia, A., Scaravelli, G., Ferraretti, A.P. and Gianaroli, L. "Head birefringence properties are associated with acrosome reaction, sperm motility and morphology", *Reproductive Bio Medicine Online*, **24**, pp. 352-359 (2012).
15. Chan, P.J., Jacobson, J.D., Corselli, J.U. and Patton, W.C. "A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge", *Fertility and Sterility*, **85**(2), pp. 481-6 (February 2006).
16. Deime, M.R., Nasresfahani, M.H., Razavi, S., Nazem, H., Sayeste, M. and Tavallaei, M. "Comparison performance of zeta method HA-binding method in immature sperm separation in terms of morphology and normal chromatin structure", *Journal of Isfahan Medical School*, **27**(92), pp. 46-56 (1388).
17. Darabi, M.R., Nasresfahani, M.H., Imani, H. and Baharvand, H. "Electrical activation of oocytes injected with malformed spermatozoa fertilization, improves results of embryonic development", *Yakhteh Medical journal*, **15**(19), pp. 171-175 (1382).
18. Ainsworth, C., Nixon, B. and Aitken, R.J. "Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa", *Human Reproduction*, **20**(8), pp. 2261-2270 (2005).
19. Simon, L., Murphy, K., Aston, K.I., Emery, B.R., Hotaling, J.M. and Carrell, D.T. "Micro-electrophoresis: A noninvasive method of sperm selection based on membrane charge", *Fertility and Sterility*, **103**(2), pp. 361-6 (February 2015).
20. Baker, M.A. and Aitken, R.J. "The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology", *Molecular and Cellular Endocrinology*, **216**, pp. 47-54 (2004).
21. Schuster, T.G., Cho, B., Keller, L.M., Takayama, S. and Smith, G.D. "Isolation of motile spermatozoa from semen samples using microfluidics", *Reproductive Biomedicine Online*, **7**(1), pp. 75-81 (16 April 2003).
www.rbmonline.com/Article/847.
22. Sin, M.L., Gao, J., Liao, C. and Wong, P.K. "System integration - a major step toward lab on a chip", *Journal of Biological Engineering*, **5**(6), (2011).
23. Lopez-Garcia, M.D.C., Monson, R.L., Haubert, K., Wheeler, M.B. and Beebe, D.J. "Sperm motion in a microfluidic fertilization device", *Biomed Microdevices*, **10**, pp. 709-718 (2008).
24. Farhang, M. and Abed, D. "Upstream; A novel method for separating human motile sperms", *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, **7**(3), pp. 141-144 (Summer 2009).
25. Matsuura, K., Takenami, M., Kuroda, Y., Hyakutake, T., Yanase, S. and Naruse, K. "Screening of sperm velocity by fluid mechanical characteristics of a cyclo-olefin

- polymer microfluidic-sorting device”, *Reproductive Bio Medicine Online*, **24**(1), pp. 109-115 (January 2012).
26. Sano, H., Matsuura, K., Naruse, K. and Funahashi, H. “Application of a microfluidic sperm sorter to the in-vitro fertilization of porcine oocytes reduced the incidence of polyspermic penetration”, *Theriogenology*, **74**(5), pp. 863-870 (15 September 2010).
 27. Kricka, L., Nozaki, O., Heyner, S., Garside, W.T. and Wilding, P. “Applications of a micro-fabricated device for evaluating sperm function”, *Clin Chem*, **39**, pp. 1944-1947 (1993).
 28. Karniadakis, G.E., Beskok, A. and Aluru, N., *Microflows and Nanoflows Fundamentals and Simulation*, Springer Science Business Media, Inc, 818 p. (2005).
 29. Shirota, K., Yotsumoto, F., Itoh, H., Obama, H., Hidaka, N., Nakajima, K. and Miyamoto, S. “Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage”, *Fertility and Sterility*, **105**(2), pp. 315-21 (2015).
 30. Knowlton, S.M., Sadasivam, M. and Tasoglu, S. “Microfluidics for sperm research”, *Trends in Biotechnology*, **33**(4), pp. 221-9 (April 2015).
 31. Ishimoto, K., Cosson, J. and Gaffney, E.A. “A simulation study of sperm motility hydrodynamics near fish eggs and spheres”, *Journal of Theoretical Biology*, **389**, pp. 187-197 (2016).
 32. Seo, D.B. “A development of the motile sperm sorting microfluidic devices”, In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy, University of Missouri-Columbia (2007).
 33. Matson, P.L., Myssonski, K., Yovich, S., Morrison, L., Irving, J. and Bakos, H.W. “The density of human semen and the validation of weight as an indicator of volume: A multicentre study”, *Society for Biology of Reproduction*, **10**(2), pp. 141-53 (28 April 2010).
 34. *Sperm Cell Separation by Electrophoresis*, EP 1689853 A1 (text from WO2005033295A1) (24 November 2013). <http://www.google.com/patents/EP1689853A1>
 35. *Zetaseizer Nano Series User Manual*, Malvern Instruments Ltd. MAN 0317, **1**, 270 p. (1 Feb. 2004).
 36. Armstrong, J.K., Wenby, R.B., Meiselman, H.J. and Fisher, T.C. “The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation”, *Biophys J*, **87**(6), pp. 4259-4270 (December 2004).
 37. Ashok, J., *Understanding Effects of Viscosity in the BioFlux System*, Technical Note, 2008 Fluxion Biosciences (24 November 2013). www.scribd.com
 38. *Dielectric Properties of Materials*, Chapter 2, National Physical Laboratory (NPL) (24 November 2013). www.kayelaby.npl.co.uk/general_physics
 39. <http://www.microwaves101.com/encyclopedia/permittivity>
 40. Yoon, G. “Dielectric properties of body fluids with various hematocrit levels”, *World Academy of Science, Engineering and Technology* **60**, pp. 640-643 (2011).