

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



SVILUPPO DI UNA PIATTAFORMA MICROFLUIDICA PER STUDI DI TRASFEZIONE GENICA NON VIRALE SU SINGOLA CELLULA

RELATORE: Prof. Alberto Cesare Luigi REDAELLI

CORRELATORI: Prof. Gabriele CANDIANI

Ing. Marco RASPONI

Ing. Paola OCCHETTA

Ing. Chiara MALLOGGI

Tesi di Laurea:

Mara LICINI

Matricola n. 770594

Anno Accademico 2012/2013

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano in particolar modo:

Professor Alberto Redaelli per la correzione e la revisione del lavoro, oltre che per la disponibilità dimostrata.

Professor Gabriele Candiani per aver messo a disposizione tutti gli strumenti e le conoscenze, soprattutto in ambito cellulare, necessarie per la crescita di questo progetto.

Ing. Marco Rasponi per avermi indirizzata verso questo percorso di tesi e avermi guidata ed affiancata durante il lavoro.

Ing. Paola Occhetta per la totale disponibilità, l'indispensabile aiuto e il supporto, che non sono mancati nemmeno a distanza di chilometri.

Ing. Chiara Malloggi per tutte le giornate passate sotto cappa e per i consigli in campo cellulare.

Ing. Gazaneo Andrea per avermi affiancata ed aiutata, soprattutto nell'ultima fase del lavoro, dimostrando una disponibilità senza eguali.

INDICE

SOMMARIO	I
ABSTRACT	XI
1.INTRODUZIONE	1
1.1. Terapia genica	1
1.2. I vantaggi della microfluidica	12
1.2.1 Analisi di singola cellula	15
1.3 Obiettivo del lavoro	23
2. MATERIALI E METODI	26
2.1. Progettazione del dispositivo microfluidico	26
2.1.1. Unità di intrappolamento: specifiche di progetto e dimensionamento geometrico	27
2.1.2. Unità di intrappolamento: Simulazioni fluidodinamiche computazionali	32
2.1.3 Generatore di gradiente: Specifiche di progetto e dimensionamento geometrico	36
2.1.4 Generatore di gradiente: simulazioni fluidodinamiche computazionali	43
2.2. Realizzazione del dispositivo microfluidico	49
2.2.1 Caratterizzazione dimensionale del dispositivo	56
2.3. Validazione sperimentale del dispositivo microfluidico	57
2.3.1. Unità di intrappolamento: validazione fluidodinamica	57
2.3.2. Unità di intrappolamento: validazione funzionale	61
2.3.3. Generatore di gradiente: validazione fluidodinamica.....	64
2.3.4. Generatore di gradiente: validazione funzionale.....	65
2.4 Validazione biologica preliminare: coltura cellulare	66
3.RISULTATI	68
3.1. Progettazione del dispositivo microfluidico	68
3.1.1. Unità di intrappolamento: dimensionamento geometrico e simulazioni fluidodinamiche computazionali	68

3.2	Realizzazione e caratterizzazione dimensionale del dispositivo microfluidico	82
3.3.	Validazione del dispositivo microfluidico	87
3.3.1.	Unità di intrappolamento: validazione fluidodinamica	87
3.3.2.	Unità di intrappolamento: validazione funzionale	88
3.3.3.	Generatore di gradiente: validazione fluidodinamica.....	93
3.3.4.	Generatore di gradiente: validazione funzionale.....	95
3.4.	Validazione biologica preliminare: coltura cellulare	99
4.	DISCUSSIONE.....	101
5.	CONCLUSIONI	113
BIBLIOGRAFIA	115

SOMMARIO

Introduzione

La terapia genica è una tecnica sperimentale che sfrutta il *gene delivery* per ottenere l'inserzione di materiale genetico all'interno di una cellula bersaglio. Lo scopo è controllarne e modularne l'espressione genica per prevenire o curare determinate patologie. Uno o più geni vengono trasferiti in una cellula malata, al fine di silenziare o sostituire il gene mutato della cellula stessa oppure di introdurre un gene non presente stimolando la sovra-espressione di proteine terapeutiche [1]. L'integrazione di tali frammenti genici all'interno del genoma richiede come prima cosa l'introduzione del DNA nella cellula bersaglio. L'iniezione diretta di DNA risulta, tuttavia, un approccio limitato a causa della degradazione che la molecola subisce e della repulsione elettrostatica che si instaura con la membrana cellulare. Per questa ragione, gli studi relativi a tale contesto si sono concentrati sullo sviluppo di metodi che facilitassero l'ingresso del materiale genetico nella cellula, in modo da ottenere una trasfezione efficace [2, 3].

Tra questi, i metodi fisici sfruttano forze fisiche per permeare la membrana cellulare e facilitare così l'internalizzazione di materiale genetico da parte della cellula. Ricorrendo però a DNA nudo, non risultano selettivi per un determinato target cellulare rendendo necessaria una somministrazione in prossimità stessa del bersaglio [4]. Per questo

motivo, gli studi sono stati indirizzati verso lo sviluppo di *carrier* in grado di veicolare efficacemente gli acidi nucleici all'interno della cellula, superandone la membrana cellulare.

Inizialmente la ricerca si è concentrata sull'uso di vettori virali, che sfruttano la naturale capacità dei virus di inserire e replicare il proprio corredo cromosomico all'interno della cellula ospite. Nonostante i vantaggi offerti in termini di elevata efficienza di trasfezione, la loro applicazione *in vivo* risulta ostacolata dalla reazione del sistema immunitario umano [5, 6].

L'interesse si è quindi spostato verso altre tipologie di vettori definiti non virali. In questo caso, l'operazione di trasferimento del DNA viene definita trasfezione e i *carrier*, a cui si ricorre, vengono denominati trasfettanti. Due sono le tipologie di vettori non virali recentemente sviluppate: lipoplessi e poliplessi [7, 8]. Entrambi sfruttano l'interazione tra gli acidi nucleici, carichi negativamente, e le molecole cariche positivamente, che costituiscono lipidi e polimeri, per formare, tramite un processo di *self assembling*, dei complessi che schermano la carica negativa del DNA. Questo con lo scopo di incorporare il materiale genetico nella cellula, evitando la generazione di forze repulsive con la membrana cellulare. I vettori non virali possono essere prodotti su larga scala con costi accettabili, offrendo, inoltre, la possibilità di trasporto di materiale

genetico di dimensioni idealmente illimitate. La progettazione di tali vettori è basata sulla necessità di bilanciare la stabilità del complesso con un facile rilascio degli acidi nucleici, in maniera da ottimizzare l'efficienza di trasfezione. Inoltre tali sistemi devono essere bio- ed immunocompatibili. Se il ricorso a lipoplessi è, in questo senso, limitato dalla loro instabilità, la possibilità di modificare la struttura e i gruppi funzionali dei complessanti polimerici, al fine di aumentare l'efficacia di trasfezione e la biocompatibilità, fa dei poliplessi l'alternativa più promettente. Tuttavia, i vettori polimerici non virali attuali mostrano ancora mancanze circa la loro efficienza complessiva [1, 9]. Per questa ragione, il futuro del *gene delivery* non virale si basa sullo sviluppo di vettori multifunzionali e piattaforme adeguate per indirizzare efficacemente il materiale genetico alle cellule bersaglio in modo sicuro e controllato. In questo contesto, la crescita in campo microfluidico crea nuove prospettive per l'ottimizzazione delle tecniche di *gene delivery* non virale, garantendo un maggior controllo spazio-temporale delle cellule target e del materiale genetico esogeno [10, 11]. L'applicazione della microfluidica agli studi di ottimizzazione di vettori non virali, permette screening rapidi per confrontare diverse configurazioni di *carrier*, in modo simultaneo e veloce, riducendo il lavoro e le tempistiche tipiche delle tradizionali operazioni manuali eseguite su larga scala. Tali piattaforme, offrono inoltre la possibilità di condurre analisi di singola cellula, per lo

sviluppo di studi deterministici dell'efficienza di tecniche di trasfezione [12, 13]. L'utilizzo di sistemi microfluidici combinati a tecnologie di *high throughput* garantiscono quindi automatizzazione e risposte precise di tipo on/off per la stima dell'avvenuta trasfezione cellulare.

Per raggiungere questo scopo, si rende quindi necessario sviluppare un metodo riproducibile che consenta di allocare singole cellule in posizioni determinate, in modo da permetterne la trasfezione e l'analisi. In letteratura sono presenti diversi approcci che, ricorrendo a trappole ottiche, magnetiche, dielettroforetiche o meccaniche, sono in grado di isolare singole cellule all'interno di dispositivi alla microscala [14]. Tra questi, l'approccio più promettente sfrutta la variazione di resistenze idrauliche per l'intrappolamento di singole cellule all'interno di canali microfluidici [15]. Il presente lavoro di tesi mira quindi a progettare una piattaforma microfluidica *high-throughput* per l'intrappolamento e l'analisi di singola cellula che consenta di superare i limiti delle tecniche di trasfezione eseguite tramite vettori non virali alla macroscala. Per questo sarà progettato, realizzato e validato un chip che permetta di isolare un numero elevato di singole cellule, garantirne la vitalità all'interno di camere di coltura, per eseguire in seguito studi di trasfezione genica. Inoltre, al fine di automatizzare i processi, il dispositivo permetterà la creazione di un gradiente di macromolecole, in particolare poliplessi, perché possa essere valutato per ogni vettore

non virale, la condizione di trasfezione al variare della concentrazione somministrata.

Materiali e Metodi

Il progetto del dispositivo microfluidico prevede il disegno di due unità funzionali: un'unità di intrappolamento e coltura cellulare e un generatore di gradiente di concentrazioni lineare. Le unità di intrappolamento sono progettate per ottenere l'isolamento di singole cellule all'interno di camere di coltura, sfruttando una resistenza idraulica variabile in modo automatico e passivo. Tale meccanismo è basato sul disegno di un'unità base caratterizzata da tre camere di intrappolamento e coltura, collegate ad un canale principale tramite due accessi diametralmente opposti. Mentre l'apertura superiore consente l'ingresso delle cellule, la connessione posta alla base, realizzata tramite un canale di dimensioni ridotte che ostacola il passaggio delle cellule, permette di intrappolarle singolarmente (Fig.1).

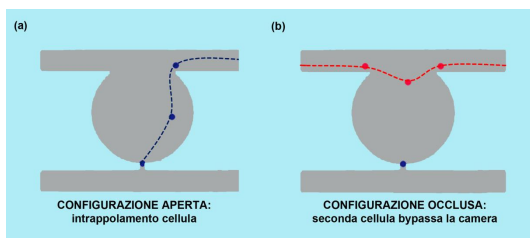


Fig. 1- Meccanismo di intrappolamento di singola cellula nella camera di coltura

L'individuazione delle dimensioni ottimali è stata ottenuta tramite studi computazionali condotti con *software Comsol Multiphysics*, eseguiti sulle geometrie di base che caratterizzano il dispositivo stesso. Per poter scegliere la combinazione di canale

principale e trappola ottimale, sono stati definiti degli indici di efficienza. A tal fine è stata condotta, per ciascuna larghezza del canale principale selezionata, una simulazione su un canale rettangolare, che permettesse di ricavare la portata minima che si deve garantire in entrata alla camera, perché si abbia ipoteticamente l'ingresso di almeno una cellula. Questa è stata poi confrontata con la partizione della portata, che si ha nelle diverse configurazioni. Gli indici ricavati da tale confronto sono: OT (occlusività della trappola), ET (efficienza di intrappolamento) e SI (selettività di intrappolamento). Questi sono stati ricavati rispettivamente come differenza tra portata in ingresso alla camera in configurazione aperta e chiusa, differenza tra portata in ingresso in configurazione aperta e Q_{lim} e differenza tra Q_{lim} e portata in ingresso in configurazione occlusa.

Per quanto riguarda l'unità di intrappolamento, fissati i valori delle altezze di canali e camere ($25\mu m$) e trappole ($5\mu m$), legati a limiti di fabbricazione, sono state svolte diverse analisi agli elementi finiti variando i valori di portata in ingresso al canale principale e gli altri parametri geometrici del dispositivo (larghezza di canali e trappole). In un secondo momento, sono state modellizzate una o più sfere a livello dell'ingresso della trappola, che simulassero l'avvenuto intrappolamento di singole cellule. Attraverso queste analisi è stata valutata la ripartizione della portata nelle camere e sono stati definiti degli indici

di efficienza, che permettessero un confronto tra diverse configurazioni possibili, per ottenere un'ottimizzazione della geometria. Tali analisi han consentito, inoltre, di stimare le cadute di carico caratterizzanti l'unità e poter fissare a 16 il numero di ripetizioni in serie delle unità stesse, sufficiente per una adeguata valutazione statistica, mantenendo pressioni nel limite dell'attuabilità.

Il generatore di gradiente, progettato sulla base del modello simmetrico introdotto da Jeon et al. [16], consente di ripartire una soluzione a data concentrazione iniziale, in 6 diluzioni lineari (da 0% a 100% con *step* di 20%), indirizzabili in maniera indipendente a sei unità di coltura poste a valle. In particolare, il generatore è stato progettato per miscelare particelle di dimensioni elevate (poliplessi con diametro variabile da 100 fino a 500nm), risultato ottenibile grazie alla presenza di particolari strutture che inducono *mixing* caotico (*herringbones*) [17]. Tale metodo risulta necessario al fine di ottenere un mescolamento uniforme di particelle di dimensioni consistenti, quali i poliplessi, non soggette alle equazioni diffusive del moto browniano. L'efficienza del processo di *mixing*, è stata verificata attraverso analisi computazionali agli elementi finiti. I miscelatori così realizzati, *staggered herringbone mixer*, permettono di diminuire il tempo necessario per il *mixing* e quindi la lunghezza del generatore stesso. Tramite queste analisi è stato possibile studiare l'andamento della concentrazione all'interno del canale all'inizio di ogni unità base (Fig.

2). I risultati sono stati poi confrontati con quelli ottenuti da geometrie prive di scanalature.

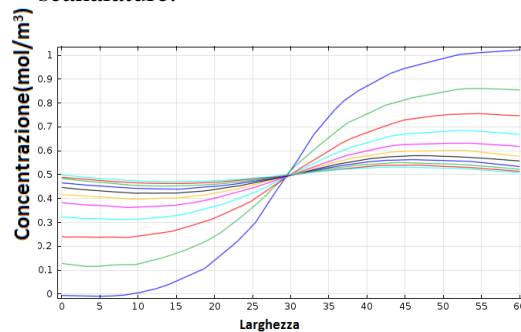


Fig. 2- Grafici ottenuti da studi condotti tramite software Comsol. Andamento della concentrazione all'interno delle sezioni *xz*, $Re=0,1$ (per portata $0,255\mu\text{L}/\text{min}$) della geometria con *herringbones*

Tramite queste analisi è stato possibile unire gli elementi di *mixing* alla struttura del generatore di gradiente e valutare la resistenza idraulica offerta dall'intero elemento così ottenuto.

Dai risultati computazionali è stato possibile selezionare 7 varianti del medesimo dispositivo (Fig.3), caratterizzate da diverse combinazioni di larghezze di canali (50, 75, 100 μm) e trappole (8, 10, 15 μm) per quanto riguarda le sei unità di intrappolamento, mantenendo costante, invece, il *layout* del generatore di gradiente.

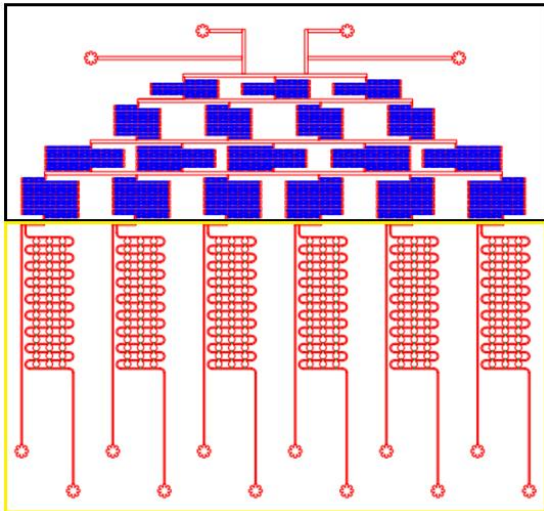


Fig. 3- Layout finale del dispositivo: generatore di gradiente (riquadro nero) e unità di intrappolamento (riquadro giallo).

Realizzati i disegni bidimensionali tramite *software* CAD, i master, copie negative funzionali dei chip, sono stati fabbricati tramite tecniche di soft litografia. Tramite questi stampi è stato possibile ottenere, con tecniche di *replica molding*, i dispositivi in polidimetilsilossano (PDMS), successivamente sigillati a un vetrino da istologia, al fine di creare canali chiusi entro cui far scorrere i fluidi di interesse.

I dispositivi sono stati caratterizzati dal punto di vista geometrico e successivamente validati da un punto di vista funzionale. Gli esperimenti condotti a tal fine han permesso di valutare, oltre alla tenuta del dispositivo nel complesso, la veridicità dei risultati ottenuti tramite analisi computazionali. Nello specifico si è analizzata l'indipendenza delle sei unità di intrappolamento e l'efficienza di intrappolamento di singola particella. Per i primi test si è seguito il percorso di una bolla, inserita all'interno del chip in diverse condizioni. Per la seconda tipologia di test

sono state immesse dai canali di semina di ogni unità di intrappolamento sfere di polistirene di diametro confrontabile a quello medio cellulare. Si sono così valutate le condizioni ottimali di semina per un intrappolamento efficace, oltre a stabilire i dispositivi che mostrassero i risultati migliori. Su questi chip sono state condotte prove di intrappolamento con cellule Hela. Per quanto riguarda il generatore di gradiente è stata valutata la capacità di realizzare *mixing* di sostanze con alto coefficiente di diffusione (*mixing* di coloranti valutato tramite analisi di assorbanza) e particelle di dimensioni consistenti (poliplessi di diametro compreso tra 100 e 500nm).

Sono state infine condotte prove di coltura cellulare preliminari, finalizzate alla valutazione della citocompatibilità del dispositivo.

Risultati e discussione

Considerato il fine ultimo del dispositivo progettato nel presente studio, ovvero l'isolamento di singole cellule per studi di trasfezione genica tramite vettori non virali, il disegno del chip è caratterizzato dalla presenza di camere di coltura di dimensioni adeguate all'interno delle quali, sfruttando la variazione di resistenza passiva, si riesca a intrappolare e coltivare singole cellule. Inoltre, per poter svolgere studi di trasfezione genica condotti a diverse concentrazioni di vettori, il dispositivo è stato dotato di un modello in grado di creare un gradiente di

fattori non solubili, indirizzabili in maniera indipendente verso le unità di coltura.

Mediante il *software Comsol Multiphysics*, è stato possibile valutare i parametri geometrici ottimali dell'unità di intrappolamento. I valori della Q_{lim} , ottenuti al variare della larghezza del canale e del raggio delle cellule, sono stati confrontati con i risultati relativi alla partizione delle portate per le diverse combinazioni di canali e trappole per dispositivi in configurazione aperta ed occlusa.

I grafici (Fig.4), ricavati da tali studi, evidenziano come le portate in ingresso alle camere in configurazione aperta, per tutte le combinazioni di canali e trappole esaminate, risultino maggiori di entrambe le soglie. Questo implica che tutte sono compatibili con l'intrappolamento di cellule del *range* dimensionale scelto (diametro 10-16 μ m). Al contrario, la percentuale di portata in ingresso in configurazione occlusa, con sfera di 16 μ m di diametro, risulta sempre minore delle Q_{lim} . Questo significa che nessuna cellula, teoricamente, può entrare nelle camere dove già ne è stata intrappolata una di tale dimensioni. Per quanto riguarda la configurazione occlusa con sfera di diametro 10 μ m, nel caso di trappole pari a 15x5 μ m per tutti i canali la porzione di portata entrante si presenta maggiore della Q_{lim} , indicando incapacità di isolare singola cellula, negli altri casi (trappole 10x5 e 8x5 μ m per tutti i canali), risultando minore, assicura intrappolamento di singola cellula. Questo perché, fin tanto che la trappola presenta

dimensioni maggiori della sfera che la chiude, vi è passaggio di trafile di fluido attraverso la trappola stessa, per cui la resistenza risulta minore al caso di completa ostruzione, permettendo l'ingresso di una quantità di portata maggiore. Ciò che emerge è quindi che le trappole di dimensioni 15 μ m non garantiscono una condizione di sufficiente occlusività in presenza di cellule.

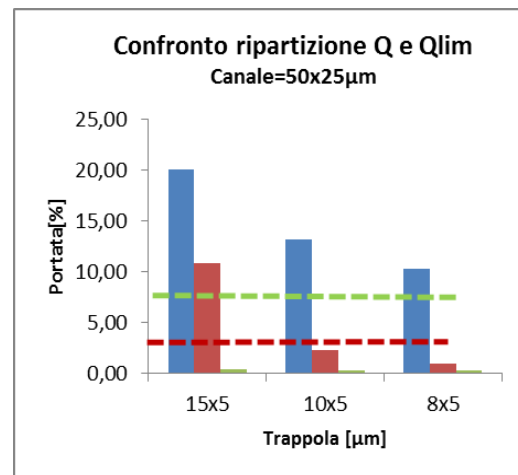


Fig. 4- Ripartizione del flusso all'interno dell'unità base in configurazione aperta ed occlusa confrontata con Q_{lim} , al variare della larghezza della trappola. Grafici relativi a dispositivi perfusi in ingresso con portata pari a 2 μ L/min e canale=50x25 μ m. In rosso è riportata la Q_{lim} per sfere di raggio 10 e in verde per sfere di raggio 16 μ m.

Partendo da tali risultati è stato possibile calcolare gli indici di efficienza necessari per un'analisi completa dell'occlusività della trappola (OT), dell'efficienza di intrappolamento (EI) e dell'efficienza di intrappolamento di singola cellula (SI). I valori massimi di OT si ottengono per trappole larghe 8 μ m, mentre i valori più bassi per trappola 15 μ m. L'indice EI mostra un andamento opposto, registrando valori massimi per trappola larga 15 μ m e minimi per trappola larga 8 μ m. L'indice SI risulta negativo per trappola larga 15 μ m, indicando

incapacità di intrappolamento di singole cellule. Limitando le analisi alle sole trappole 10x5 e 8x5 μm , si riscontrano valori migliori ottenuti in combinazione con canale largo 50 μm .

Le trappole larghe 8 μm , pur essendo le più efficienti in linea teorica, per limiti di fabbricazione hanno presentati difetti realizzativi, e non sono state, quindi, sottoposte a esperimenti pratici. Dalle prove di funzionalità effettuate sull'unità di intrappolamento più promettenti è stato possibile selezionare due dispositivi (canale largo 50 μm e trappole larghe 10 e 15 μm), a conferma dei risultati computazionali, di cui è stato messo a punto un protocollo di semina, che prevede un controllo in pressione.

La fase di validazione sperimentale dell'unità di intrappolamento mostra, per prima cosa, come l'indipendenza delle unità sia mantenuta fin tanto che la portata di perfusione si mantiene al di sotto di 12 $\mu\text{L}/\text{min}$. Tale limite cresce fino a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, nel caso in cui in ingresso al generatore di gradiente viene imposta una portata pur piccola (dell'ordine dei $\mu\text{L}/\text{h}$) che si oppone alla prima.

Le prove condotte per la validazione funzionale hanno portato poi a definire la pressione da imporre alla sospensione (pari a 100mmHg), perché sia assicurato l'intrappolamento di singole cellule. A una pressione inferiore, le cellule tendono a depositarsi, ostruendo i canali. A pressioni maggiori, la velocità della sospensione

spinge più sfere ad entrare nella medesima camera, non assicurando, quindi, l'intrappolamento di singole cellule. Oltre a ottimizzare il protocollo di semina, tali esperimenti consentono di evidenziare le combinazioni di canale e trappola migliori (canali larghi 50 μm e trappole larghe 10 e 15 μm), sottoposti a successivi test cellulari con cellule Hela (diametro 16 $\mu\text{m}\pm 2.1$). Per entrambi i dispositivi è confermata la capacità di intrappolare singole cellule in maniera rapida (Fig.5), ottenendo però percentuali di efficienza inferiori al 50%. Tali risultati sono fortemente influenzati dalla presenza di detriti che bloccando il passaggio della sospensione cellulare o la trappola stessa, ne inficiano l'efficienza. Vi sono, infatti, unità che han mostrato un'efficienza del 80%. A seguito di queste prove, inoltre, è emerso come le trappole da 15 μm risultino meno adatte a cellule di diametro inferiore al proprio e più sensibili alle variazioni di pressione, venendo scartate anch'esse.

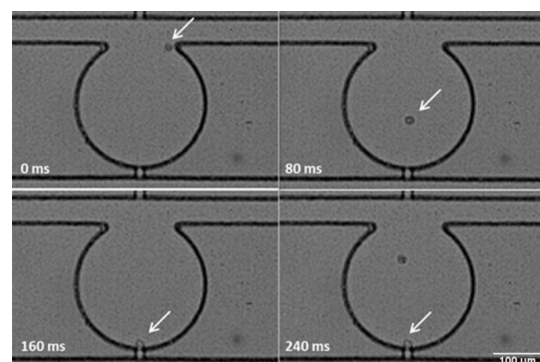


Fig. 5- Percorso seguito dalla cellula all'interno del dispositivo, in diversi istanti temporali. Immagine in contrasto di fase del dispositivo con canali 50x25 e trappola 15x5 μm . In evidenza il percorso della prima cellula che viene intrappolata impedendo l'ingresso della seconda cellula (Ingrandimento 80X).

Le analisi computazionali condotte sul generatore di gradiente han permesso di

valutare la sua effettiva capacità di diluire una soluzione in ingresso in 6 partizioni lineari, individualmente indirizzabili alle 6 unità di coltura. Il mescolamento di tipo caotico risulta adeguato già dopo 10 unità di *staggered herringbone mixer* (HB), cosa non ottenibile utilizzando canali privi di tali scanalature. Il *mixing* risulta più efficace per portate maggiori; all'aumentare dei livelli del generatore, e quindi al diminuire della porzione di portata che scorre all'interno dei suoi rami, è necessario aumentare il numero di successioni di unità HB per assicurare un mescolamento omogeneo.

La validazione fluidodinamica ha poi permesso di verificare che le portate in uscita dal gradiente coincidessero tra loro e corrispondessero a quelle calcolate in fase di progettazione. Tramite prove condotte con due coloranti alimentari (Fig.6) è stata valutata l'efficienza di *mixing* di sostanze ad alto coefficiente di diffusione. I dati ottenuti tramite spettrofotometro evidenziano una diminuzione lineare dell'assorbanza del blu (e quindi della sua concentrazione) passando dall'uscita cui dovrebbe corrispondere una concentrazione di blu massima (100%), verso quella opposta.

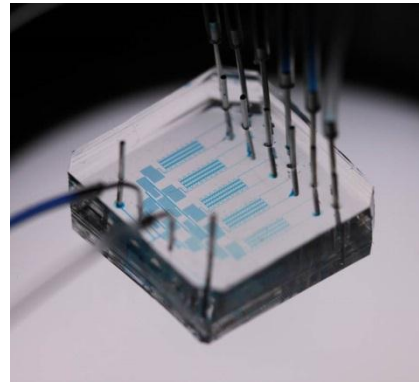


Fig. 6- Ripartizione del flusso all'interno del network costituente il generatore di gradiente.

A queste prove sono seguiti esperimenti condotti con condrociti nasali (diametro medio di $10\mu\text{m}$) che han permesso di verificare in modo qualitativo la generazione di gradiente di particelle di dimensioni consistenti.

Infine, prove di coltura cellulare preliminari, finalizzate alla verifica della citocompatibilità del dispositivo microfluidico, sono state condotte su chip caratterizzati da canali di dimensioni $50 \times 25\mu\text{m}$ e trappole pari a $10 \times 5\mu\text{m}$, monitorati per 2 giorni. Cellule di glioblastoma umano primario U87, con concentrazione pari a $0,2 \cdot 10^6 \text{cell/ml}$ e una pressione di semina di 100mmHg , sono state intrappolate nel dispositivo e messe in coltura con una portata di perfusione costante pari a $30\mu\text{L/h}$. La forma delle cellule risulta strettamente collegata al comportamento delle stesse: presenza di protusioni che si allargano e si appiattiscono permettono crescita, espressione genica e differenziamento; cellule sferiche favoriscono fenomeni apoptotici. Fino al giorno 2, le cellule si mostrano vitali.

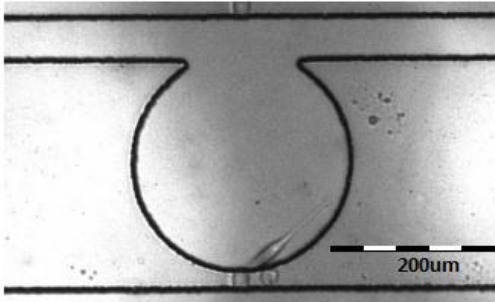


Fig. 6- Singola cellula intrappolata e monitorata dopo 24h dalla semina (Ingrandimento 8X).

Conclusioni

In questo lavoro è stato progettato, realizzato e validato un dispositivo in grado di intrappolare singole cellule mantenendole in coltura per almeno 2 giorni, potendo, inoltre, creare diverse diluizioni di particelle di dimensioni consistenti, da indirizzare verso le unità di intrappolamento indipendenti. Gli esperimenti condotti sul dispositivo, confermando i risultati computazionali, mostrano come questo presenti una buona efficienza di intrappolamento di singola cellula, quando l'unità risulta priva di residui e imperfezioni. La citocompatibilità del chip, realizzato in PDMS e trattato con plasma e successivamente poli-L-lisina (PLL) [18], ha consentito la coltura di cellule U87 per 2 giorni. Grazie alle sue caratteristiche, questo dispositivo microfluidico può consentire l'ottimizzazione di tecniche di trasfezione non virale attraverso una valutazione *high-throughput*. Il generatore di gradiente permette di valutare in parallelo l'effetto di una somministrazione di concentrazione di poliplessi diversa alle cellule. L'intrappolamento di singola cellula permette di ottenere una risposta diretta di tipo on/off,

senza ricorrere a modelli statistici da applicare a una popolazione cellulare eterogenea.

Questa soluzione presenta però alcuni limiti, che sviluppi e studi futuri potrebbero superare, migliorando ulteriormente i risultati ottenuti. La prima criticità riguarda la pulizia dei dispositivi, in tal senso si rende necessario trovare un procedimento veloce ed efficace che permetta di eliminare tutte le impurità presenti, in modo che queste non incidano sull'efficienza di intrappolamento del chip stesso. Sarebbe quindi preferibile realizzare i dispositivi in ambienti con atmosfera controllata (*clean room*). Andrebbe, inoltre, studiato un protocollo di semina e coltura specifico per ogni tipo cellulare, per valutare la pressione ideale di isolamento e le condizioni ottimali per la loro coltura. Si potrebbero, infatti, studiare gli effetti di diversi trattamenti superficiali cui sottoporre il dispositivo per migliorarne le proprietà di adesione e di idrofilicità.

Bibliografia

1. Pezzoli, D., et al., *We still have a long way to go to effectively deliver genes!* J Appl Biomater Funct Mater, 2012. **10**(2): p. 82-91.
2. Niidome, T. and L. Huang, *Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors.* Gene Ther, 2002. **9**(24): p. 1647-52.
3. Mintzer, M.A. and E.E. Simanek, *Nonviral vectors for gene delivery.* Chem Rev, 2009. **109**(2): p. 259-302.
4. Mehier-Humbert, S. and R.H. Guy, *Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells.* Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(5): p. 733-53.
5. Robbins, P.D. and S.C. Ghivizzani, *Viral Vectors for Gene Therapy.* Pharmacology & Therapeutics, 1998. **80**(1): p. 35-47.
6. Lundstrom, K., *Latest development in viral vectors for gene therapy.* Trends Biotechnol, 2003. **21**(3): p. 117-22.
7. Candiani, G., et al., *Bioreducible liposomes for gene delivery: from the formulation to the mechanism of action.* PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13430.
8. Zhang, S., et al., *Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery.* J Control Release, 2004. **100**(2): p. 165-80.
9. Al-Dosari, M.S. and X. Gao, *Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress.* AAPS J, 2009. **11**(4): p. 671-81.
10. Kim, J., et al., *Microfluidic approaches for gene delivery and gene therapy.* Lab Chip, 2011. **11**(23): p. 3941-8.
11. Migita, S., et al., *Transfection efficiency for size-separated cells synchronized in cell cycle by microfluidic device.* Biomed Microdevices, 2011. **13**(4): p. 725-9.
12. Lecault, V., et al., *Microfluidic single cell analysis: from promise to practice.* Current Opinion in Chemical Biology, 2012. **16**(3-4): p. 381-390.
13. Roman, G.T., et al., *Single-cell manipulation and analysis using microfluidic devices.* Anal Bioanal Chem, 2007. **387**(1): p. 9-12.
14. Lindstrom, S. and H. Andersson-Svahn, *Overview of single-cell analyses: microdevices and applications.* Lab Chip, 2010. **10**(24): p. 3363-72.
15. Hong, S., Q. Pan, and L.P. Lee, *Single-cell level co-culture platform for intercellular communication.* Integr Biol (Camb), 2012. **4**(4): p. 374-80.
16. Jeon, N.L., et al., *Generation of Solution and Surface Gradients Using Microfluidic Systems.* Langmuir, 2000. **16**(22): p. 8311-8316.
17. Kee, S.P. and A. Gavriilidis, *Design and characterisation of the staggered herringbone mixer.* Chemical Engineering Journal, 2008. **142**(1): p. 109-121.
18. Zhou, J., A.V. Ellis, and N.H. Voelcker, *Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices.* Electrophoresis, 2010. **31**(1): p. 2-16.

ABSTRACT

Introduction

Gene therapy is an experimental technique involves the insertion of genetic material within a target. The aim is to control and modulate gene expression to prevent or treat certain diseases. One or more genes are transferred in a diseased cell, in order to silence or replace a cell mutated gene or to introduce a exogenous gene stimulating the over-expression of therapeutic proteins [1]. The integration of gene fragments into the genome primarily requires the introduction of the DNA into the target cell. However, the direct injection of DNA is limited due to the degradation the molecule undergoes and the electrostatic repulsion established with the cell membrane. For this reason, studies relating to this context, have been focused on the development of methods which facilitated the genetic material internalization within the cells, in order to obtain an effective transfection [2, 3]

Among them, the physical methods take advantage of physical forces to permeate the cell membrane and thus facilitate the internalization of genetic material by the cell. However, exploiting naked DNA, they result aspecific, requiring for administration in the proximity of the target cells [4]. For this reason, studies have been directed towards the development of carriers able to effectively convey the nucleic acids inside the cell, overcoming the cell membrane repulsion.

Initially, the research has been focused on the use of viral vectors, exploiting the natural ability of viruses to enter and replicate their chromosome within the host cells. Despite the advantages offered in terms of high transfection efficiency, their application in vivo is prevented by the reaction of the human immune system [5, 6].

The interest has therefore shifted to other types of vectors, defined non-viral vectors. In this case, the transfer operation of the DNA is defined transfection and the carrier named transfectants. Two types of non-viral vectors have recently been developed: lipoplexes and polyplexes [7, 8]. Both of them take advantage of the interaction between the nucleic acids, negatively charged, and positively charged molecules, which constitute lipids and polymers, to form, through a process of self-assembly, complexes that overall screen the negative charge of the DNA. The aim is the incorporation of genetic material into the cell, avoiding the generation of repulsive force with the cell membrane. The non-viral vectors can be produced on a large scale with acceptable costs, offering, in addition, the possibility of transport genetic material of ideally unlimited dimensions. The design of such vectors is based on the balance between complex stability and easy release capacity of nucleic acids, in order to optimize the transfection efficiency. Moreover, they have to shown high bio-and immunocompatibility. If the use of lipoplex is in this sense limited

by their instability, the possibility to modify the structure and the functional groups of the polymers, makes polyplexes the most promising alternative, in order to increase the transfection efficacy and biocompatibility. However, polymeric non-viral vectors still show deficiencies concerning their overall efficiency [1, 9]. For this reason, the future of non-viral gene delivery is based on the development of multifunctional vectors and suitable platforms, to addressing the challenge of effectively and safely deliver to target cells.

Considering this background, the growth of microfluidic creates new prospects for the optimization of non-viral gene delivery techniques, ensuring a better spatio-temporal control over both the target cells and the exogenous genetic material [10, 11]. The application of microfluidics for the optimization of non-viral vectors allows for rapid screening among different configurations of carriers, reducing the work and of the traditional time-consuming large scale manual operations. Microfluidic platforms also offer the possibility of performing single cell analysis, which allows for the development of deterministic studies concerning the transfection efficiency. Microfluidic systems combined with high throughput technologies thus have the potentiality to provide precise answers for the optimization of non viral gene delivery approaches [12, 13].

To achieve this purpose is thus required the ability to allocate individual cells in certain positions in a reproducible way, allowing for

precise and controlled transfection and analysis. In literature, there are several approaches that, exploiting optical, magnetic, dielectrophoretic or mechanical traps, show the ability to isolate individual cells within microscale devices [14]. Among these, the most promising approach takes advantage of passive variation of hydraulic resistances for the trapping of single cells within microfluidic channels [15].

The present work thus aims to design a high-throughput microfluidic platform for the trapping and analysis of single cells, with the perspective to overcome the limitations of traditional transfection techniques. For this reason a microfluidic chip will be designed, fabricated and validated, that allows to isolate a large number of individual cells ensuring high vitality within the culture chambers to perform gene transfection studies. Furthermore, in order to automate processes, the device will allow for the creation of non diffusive molecules (poliplexes) concentration gradients, for evaluating different non-viral vectors conformations and concentrations in a high throughput manner.

Material and Methods

The design of the microfluidic device consists in two functional units: a cell trapping and culture unit and a generator of linear concentration gradient. The trapping are designed to obtain the isolation of individual cells within culture chambers, exploiting a hydraulic resistance, which varies in an automatic and passive way. The basic trapping unit is characterized by three

entrapment and culture chambers, connected to the main channel through two inlets. While the upper opening allows cells to entry, the connection at the base, realized through a channel of smaller dimensions, blocks the cells allowing to trap them individually (Fig.1).

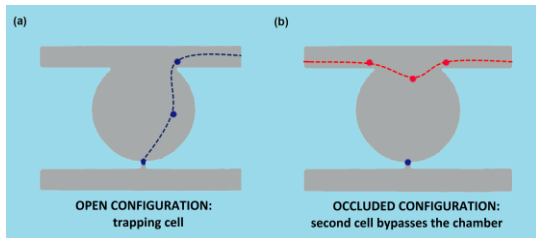


Fig. 1- Trapping mechanism within a single cell culture chamber

The optimal dimensions, guarantying for single cell trapping, were evaluated by computational studies, performed on the trapping unit. Once fixed the values of the channels and chambers heights ($25\mu\text{m}$) and traps heights ($5\mu\text{m}$), defined by fabrication limits, various finite element analysis were performed by varying the values of input flow rate and of the remaining main geometric parameters of the device (width of channels and traps). Moreover, one or more spheres on the entrance level of the trap were modeled that simulate the entrapment of single cells.

Through these analyzes the flow distribution among the chambers was evaluated and indices of efficiency were defined that would allow for a comparison among different possible configurations, to achieve an optimization of the geometry. Moreover, the pressure drop, characterizing the unit, was

estimated by means of numerical simulations leading at fixing to 16 the number of serial unit repetitions. The total number of single cell culture chamber thus obtained (48 each condition) was estimated to be enough for a relevant statistical evaluation, maintaining pressure within the limit.

The gradient generator, based on the symmetric model design introduced by Jeon et al. [16], allows to split an initial concentrated solution in 6 linear dilutions (from 0% to 100% in steps of 20%), independently addressable to six downstream culture units. The generator is designed to mix particles of large dimensions (polyplexes with diameters ranging from 100 to 500nm) not subject to the diffusive equations of Brownian motion. This has been achieved implementing particular structures (herringbones) [17] within the gradient layout, which induce chaotic mixing decreasing the mixing time and hence the length of the generator itself. The efficiency of the mixing process has been verified through computational analysis using software Comsol. Through these analyzes it was possible to study the trend of the concentration inside the channel at the beginning of each base unit (Fig. 2). The results were compared with those obtained from no grooves geometries.

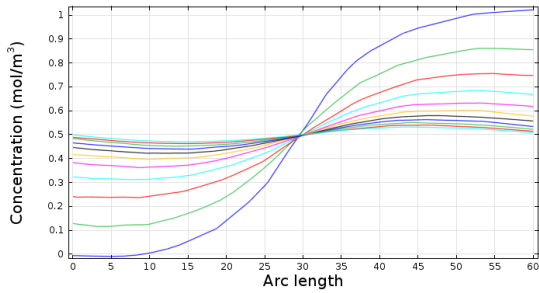


Fig.2- Graphs obtained from studies using Comsol software. Concentration Curves for flow within the sections xz , $Re=0,1$ ($0,255 \mu\text{L} / \text{min}$) of the geometry with herringbones.

An integration between the chaotic mixing elements and the gradient generator structure was thus obtained, while the overall resistance offered by the entire element was assessed.

Starting from the computational results it was possible to select 7 variants of the same device (Fig.3), characterized by different combinations of channel (50, 75, 100 μm) and traps (8, 10, 15 μm) widths, keeping constant the layout of the generator of the gradient.

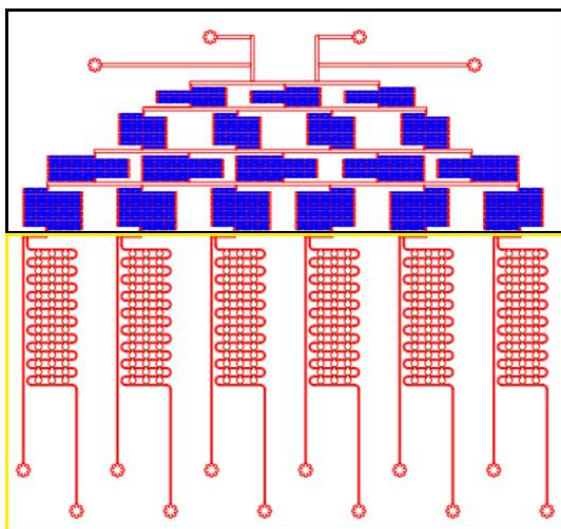


Fig 3 - Layout of the final device: HB gradient generator (black box) and trapping units (yellow box).

The device master molds have been fabricated by soft lithography techniques starting from the silicon wafer obtained through photolithography from the two-dimensional CAD drawings. The final PDMS (polydimethylsiloxane) devices were then sealed to a glass slide, in order to create closed channels within which to slide the fluids of interest.

The devices were first characterized by means of geometrical measurements and subsequently their fluidodynamic and functionality were assessed. These experiments allowed to evaluate, in addition to the sealing device, the accuracy of the results obtained through computational analyzes. Specifically, the independence of the six trapping units and the efficiency of single particles trapping were assessed. First, the path of a bubble was followed within the device, inserted inside the chip under different conditions.

For the trapping efficiency studies, polystyrene spheres with a diameter comparable to cells have been used. In this way the optimal seeding pressure was evaluated for an effective entrapment. Moreover, the most promising device layouts were established in terms of trapping capacity. These selected devices were used for HeLa cells trapping experiments. Regarding the gradient generator, the ability to achieve mixing of both substances with a high diffusion coefficient (mixing of dyes evaluated through analysis of absorbance) and of bigger size particles was evaluated.

Finally, preliminary biological cell culture experiments were conducted to evaluate the device cytocompatibility.

Result and discussion

The device developed in this study has been designed with the final aim of isolating single cells for studies of gene transfection using non-viral vectors. To achieve this scope the presented chip consists on serial culture chambers within which, exploiting the variation of passive resistance, it's possible to entrap and cultivate individual cells. Furthermore, in order to perform studies of gene transfection conducted at different concentrations of carriers, the device has been modified to allow for creating a parallel gradient of not soluble factors, independently addressable to six culture units.

Using the software Comsol Multiphysics, it was possible to evaluate the optimal geometric parameters of the trapping unit. Efficiency indices were thus defined in order to choose the optimal combination of the main channel and trap. For each main channel width, a simulation was conducted to estimate the minimum flow rate required for ensuring the inlet of at least one cell into the chamber. The values of these Q_{lim} , obtained varying the width of the channel and the radius of the cells, were compared with the results of the partition of the flows for the different combinations of channels and traps. The graphs (Fig. 4) obtained from these studies show that the flow in the chambers in the open configuration, for all combinations

of channels and traps, are higher than both the thresholds. All the configurations are thus compatible with the trapping of cells in the selected size range (10-16 μ m). In contrast, the percentage of the input flow in occluded configuration, with spheres of 16 μ m in diameter, is always smaller than the Q_{lim} . This means that no cells can enter the rooms, when a cell had already been trapped. Regarding the configuration occluded with spheres of diameter 10 μ m, in all the cases involving 15x5 μ m traps, the portion of the incoming flow is higher than the Q_{lim} , suggesting inability to isolate single cell. In the other cases (for traps 10x5 and 8x5 μ m, all channels) this value is lower than Q_{lim} , ensuring single cell trapping. As long as the trap has larger dimensions than the sphere that occluded it, indeed, fluid leakage through the trap results in lower resistance compared to the case of complete obstruction, allowing the entry of a greater amount of flow. In summary, the traps of 15 μ m do not overall guarantee a condition of complete occlusivity.

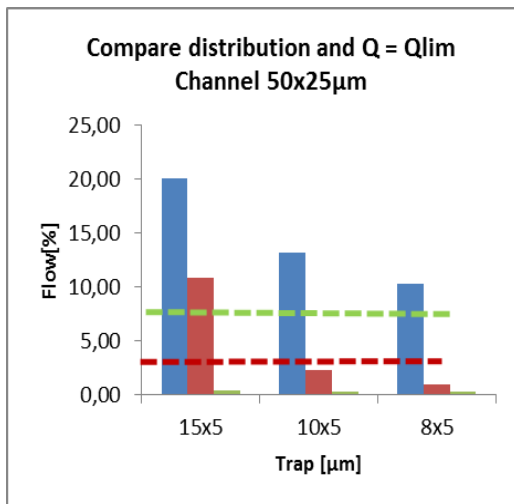


Fig. 4 - Distribution of the flow inside the unit in the open and closed configuration, comparing with Q_{lim} , varying the width of the trap. Graphs of input devices perfused with flow rate equal to $2\mu\text{L}/\text{min}$ and channel = $50 \times 25\mu\text{m}$. The line green represents the Q_{lim} calculated for sphere of $16\mu\text{m}$ and the red one for sphere of $10\mu\text{m}$.

Based on these results it was possible to calculate the performance indices needed for a comprehensive analysis of the trap occlusivity (OT), trapping efficiency (EI) and efficiency of trapping of single cell (SI). They are defined respectively as the difference between open and closed configuration chamber input flow rate (OT), the difference between open configuration input flow rate and Q_{lim} (EI) and difference between Q_{lim} and inlet flow in occluded configuration (SI). Thus, the combinations maximizing these values were evaluated.

The maximum values of OT are obtained for the $8\mu\text{m}$ wide traps, while the lowest values for the $15\mu\text{m}$ ones. The index EI shows an opposite trend recorded maximum values for $15\mu\text{m}$ wide trap and minimum for $8 \times 5\mu\text{m}$ ones. The index SI is negative for $15\mu\text{m}$ wide traps, sign of no ability for trapping single cells. Analyzing the traps 10×5 and $8 \times 5\mu\text{m}$,

the best values are found in combination with the $50\mu\text{m}$ wide channel.

The $8\mu\text{m}$ wide traps, although efficient in principle, have been definitively dismissed and not used for practical experiments. Due to limits of fabrication related to the use of photolithographic techniques. From the performed functionality tests on the most promising units of entrapment, it was possible to select two devices ($50\mu\text{m}$ wide channel and large trap $10,15\mu\text{m}$), confirming the computational results. For these devices a protocol for seeding has been developed and optimized, which exploits a pressure control.

The phase of experimental validation unit will first show how the independence of the units of entrapment is maintained as long as the flow rate of perfusion is maintained below $12\mu\text{L}/\text{min}$. This limit grows to $50\mu\text{L}/\text{min}$, when a flow rate of the order of $\mu\text{L}/\text{h}$ is imposed to the generator.

The ideal pressure to be imposed on the cell suspension for seeding was fixed at 100 mmHg , assuring the trapping of single cells. At lower pressures the spheres in polystyrene indeed didn't show the ability to flex towards the trap. At higher pressures, on the other side, more spheres run in the same chamber, not ensuring the trapping of single cells. In addition to optimizing the seeding protocol, experiments performed with HeLa cells (diameter $16\mu\text{m}$) allow to experimentally confirm the best combinations of channel and trap ($50\mu\text{m}$ wide channels and traps 10 and $15\mu\text{m}$ wide). For both devices the ability of trapping individual cells in a rapid way was confirmed

(Fig.5), thus obtaining percentages of efficiency lower than 50%. These results are strongly influenced by the presence of debris, that block the passage of the cell suspension or the trap itself, impairing its efficiency. There are, in fact, units that have shown an efficiency up to 80%. Moreover, the traps to 15 μ m have been shown to be less suitable for cells of variable size and more sensitive to pressure variations, being also discarded.

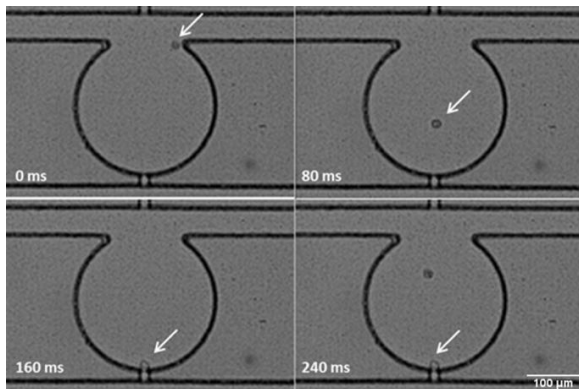


Fig 5 - Path followed by the cell inside the device at different time point. Phase contrast image of the device with channels 50x25 and trap 15x5 μ m. Highlights the path of the first cell that is trapped preventing the entry of the second cell (Magnification 8X).

At the same time, the computational analyzes conducted on the gradient generator allowed to evaluate the effective capacity of this element to dilute an initial solution of particles with a diameter beyond the limits of diffusion, in 6 linear partitions, individually addressable to 6 units of culture. It was verified that the mixer creates a radial flow which increases the contact interface and decreases the thickness within generates the spread, improving their efficiency. The achieved mixing was shown to be uniform already after 10 units of HB, result which was not achievable using channels without grooves. The number of HB repetitions,

relative to the vertical coils and useful for the achievement of the desired result, is obtained thanks to the results of the fluidic analysis and study of the pressure drop. It is necessary to considerate the fact that the mixing is better for higher flow rates. For this reason increasing the levels of the generator, and then the portion of the flow flowing inside the branches, we must increase the number of sequences of HB units to ensure a homogeneous mixing.

The fluidic validation permitted to verify that the flow at the gradient outlets coincide among all of them (guaranty of symmetry) and corresponded to those calculated in the design phase. The data obtained through spectrophotometer on the mixing of two dyes (Fig.6) showed a linear decrease of the absorbance of blue wavelength (and therefore of its concentration), passing from the exit which should correspond to a concentration of blue maximum (100%), towards the opposite one.

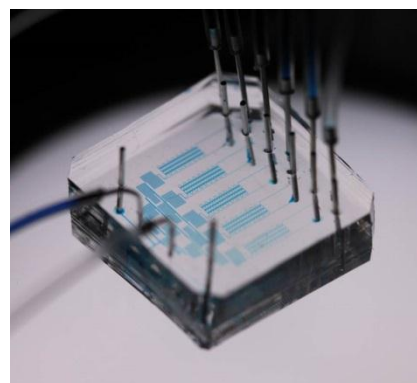


Fig.6- Distribution of the flow within the network constituting the gradient generator.

These tests are followed by experiments conducted with nasal chondrocytes (diameter 10 μ m), that have allowed to verify, in

qualitative way, the generation of particles gradient.

Finally, preliminary tests of cell culture, aimed at verifying the cytocompatibility of the microfluidic device, were conducted on chip characterized by size channels $50 \times 25 \mu\text{m}$ and traps equal to $10 \times 5 \mu\text{m}$ and monitored for 2 days. U87 cells with a concentration of seeding equal to $0.2 \cdot 10^6 \text{ cell/ml}$ and an entrapment pressure of 100 mmHg have been trapped in the device and cultured with a perfusion flow rate of $30 \mu\text{L/h}$. The shape of the cells is closely related to the behavior of the same: the presence of protrusions, which become wider and flatten, allow growth, gene expression and differentiation; spherical cells promote apoptosis. Until the day 2 cells show themselves vital.

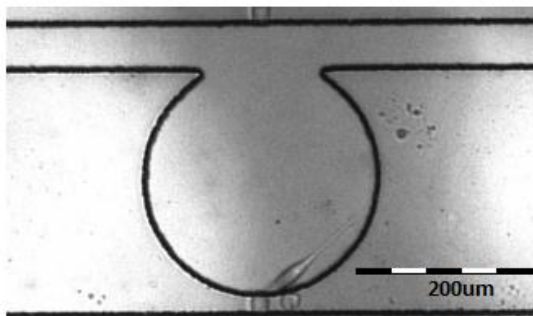


Fig. 6 - Single cell trapped and monitored after 24 h after sowing (Magnification 8X).

Conclusion

In this work, a device capable of trapping individual cells keeping them in culture for 2 days was designed, fabricated and validated. the device is also capable of creating different dilutions of particles of consistent size to them address to the individual trapping units in an high throughput manner. The experiments carried out on the device confirm the computational results showing a good efficiency of the single-cell trapping, when the units are free of debris and imperfections. The cytocompatibility of the chip, made of PDMS and treated with plasma and subsequently poly-L-lysine (PLL) [18],

allows for 2 days cell culture. Thanks to its characteristic, this device represents an interesting alternative to traditional and conventional laboratory techniques for gene transfection, showing advantages in terms of costs and time of manufacture. This microfluidic device will allow for the optimization of non-viral transfection techniques through an evaluation of their high-throughput efficiency. The gradient generator indeed allows to evaluate, at the same time, the effect of administration of different polyplexes concentration to the cells. The trapping of single cell allows to obtain an on / off, without resorting to statistical models to be applied to heterogeneous populations.

However, the presented solution has some limitations, that developments and future studies would overcome, improving the results. The first problem concerns the cleaning of the devices to remove all the impurities, so that these will not affect the efficiency of entrapment. Therefore it would be preferable to make the devices in environments with controlled atmosphere (clean room). It should also be studied a protocol of seeding and culture for each specific cell type, to evaluate the ideal pressure of isolation and optimal condition for culturing. It may also be study the effects of different surface treatments applied to the device in order to improve the adhesion properties and hydrophilicity.

Bibliography

1. Pezzoli, D., et al., *We still have a long way to go to effectively deliver genes!* J Appl Biomater Funct Mater, 2012. **10**(2): p. 82-91.
2. Niidome, T. and L. Huang, *Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors.* Gene Ther, 2002. **9**(24): p. 1647-52.
3. Mintzer, M.A. and E.E. Simanek, *Nonviral vectors for gene delivery.* Chem Rev, 2009. **109**(2): p. 259-302.
4. Mehier-Humbert, S. and R.H. Guy, *Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells.* Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(5): p. 733-53.
5. Robbins, P.D. and S.C. Ghivizzani, *Viral Vectors for Gene Therapy.* Pharmacology & Therapeutics, 1998. **80**(1): p. 35-47.
6. Lundstrom, K., *Latest development in viral vectors for gene therapy.* Trends Biotechnol, 2003. **21**(3): p. 117-22.
7. Candiani, G., et al., *Bioreducible liposomes for gene delivery: from the formulation to the mechanism of action.* PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13430.
8. Zhang, S., et al., *Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery.* J Control Release, 2004. **100**(2): p. 165-80.
9. Al-Dosari, M.S. and X. Gao, *Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress.* AAPS J, 2009. **11**(4): p. 671-81.
10. Kim, J., et al., *Microfluidic approaches for gene delivery and gene therapy.* Lab Chip, 2011. **11**(23): p. 3941-8.
11. Migita, S., et al., *Transfection efficiency for size-separated cells synchronized in cell cycle by microfluidic device.* Biomed Microdevices, 2011. **13**(4): p. 725-9.
12. Lecault, V., et al., *Microfluidic single cell analysis: from promise to practice.* Current Opinion in Chemical Biology, 2012. **16**(3-4): p. 381-390.
13. Roman, G.T., et al., *Single-cell manipulation and analysis using microfluidic devices.* Anal Bioanal Chem, 2007. **387**(1): p. 9-12.
14. Lindstrom, S. and H. Andersson-Svahn, *Overview of single-cell analyses: microdevices and applications.* Lab Chip, 2010. **10**(24): p. 3363-72.
15. Hong, S., Q. Pan, and L.P. Lee, *Single-cell level co-culture platform for intercellular communication.* Integr Biol (Camb), 2012. **4**(4): p. 374-80.
16. Jeon, N.L., et al., *Generation of Solution and Surface Gradients Using Microfluidic Systems.* Langmuir, 2000. **16**(22): p. 8311-8316.
17. Kee, S.P. and A. Gavriilidis, *Design and characterisation of the staggered herringbone mixer.* Chemical Engineering Journal, 2008. **142**(1): p. 109-121.
18. Zhou, J., A.V. Ellis, and N.H. Voelcker, *Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices.* Electrophoresis, 2010. **31**(1): p. 2-16.

1.INTRODUZIONE

Il presente lavoro di tesi mira a progettare una piattaforma microfluidica che permetta l'ottimizzazione di tecniche di trasfezione eseguite tramite vettori non virali, con lo scopo di valutarne l'efficienza in maniera *high-throughput*. L'obiettivo che si prefigge tale studio è superare gli attuali limiti presentati dalla terapia genica attraverso analisi di singola cellula, realizzabile tramite un dispositivo in grado di processare piccole quantità di materiale. Si punta quindi ad automatizzare operazioni lente e dispendiose di macroscale, realizzando un'acquisizione simultanea di più informazioni, che porti a risposte di tipo on/off. Tale risultato è conseguibile grazie, anche, alla creazione di un gradiente di molecole, in particolare poliplessi, che consenta la valutazione delle condizioni di trasfezione al variare della concentrazione di vettori non virali somministrata

1.1. Terapia genica

Negli ultimi decenni, i numerosi progressi conseguiti hanno portato all'isolamento del DNA e alla scoperta che l'informazione genetica sia codificata lungo questa stessa catena polinucleotidica, oltre che ottenere informazioni derivate dal sequenziamento dell'intera sequenza genomica. Tali scoperte hanno portato alla maturazione di nuove strategie terapeutiche per il trattamento di determinate patologie, attraverso approcci genetici e cellulari, collettivamente denominate "terapia genica" [1].

La terapia genica è una metodologia sperimentale che utilizza tecniche di *gene delivery* per l'inserzione di materiale genetico all'interno di una cellula bersaglio al fine di controllarne e modularne l'espressione genica, con lo scopo di prevenire o curare diverse patologie. Questo approccio trova applicazione in modo particolare nel trattamento di malattie rare ereditarie, come il Parkinson, così come nella cura di quelle acquisite, quali il cancro [2]. La terapia genica mira a curare le cause piuttosto che i sintomi della malattia e, per tale ragione, emerge come alternativa rivoluzionaria ai tradizionali metodi terapeutici, guadagnando, negli ultimi due decenni, una significativa attenzione per le finalità terapeutiche ma acquistando inoltre importanza nella ricerca di base per lo studio dell'espressione genica, della funzione delle proteine e delle interazioni tra di esse [1].

Il materiale genetico, coinvolto in tali terapie, è proprio costituito dal DNA, polimero organico composto da monomeri, chiamati nucleotidi, il cui ordine nella disposizione sequenziale costituisce appunto l'informazione genetica. Quest'ultima è tradotta attraverso il codice genetico in una catena di amminoacidi corrispondenti a triplette di basi azotate e la sequenza così prodotta, detta polipeptide, porta alla formazione delle proteine, le quali svolgono compiti importanti per le funzioni cellulari, servendo anche come elementi di costruzione. Negli eucarioti le tappe che da un gene, sequenza definita di nucleotidi, portano alla produzione di una proteina prendono il nome di paradigma della biologia e comprendono: la trascrizione del doppio filamento di DNA (dsDNA) in RNA primario da parte della RNA polimerasi II, la maturazione del trascritto primario in RNA messaggero (mRNA), il trasporto di mRNA nel citoplasma e la sua traduzione in una proteina. La sintesi proteica è possibile, quindi, solo in presenza di una molecola intermedia di RNA, che è generata per complementarietà con le quattro basi dei nucleotidi del DNA. Ogni qual volta è necessaria una proteina, il filamento di RNA viene elaborato in modo che le parti non codificanti siano rimosse e poi usato come stampo per la produzione della specifica proteina che, insieme all'intera composizione proteica, determina le funzioni e il fenotipo della cellula stessa. Per evitare la perdita di informazione nel passaggio tra diverse generazioni cellulari, l'informazione genetica, e quindi il DNA, che si trova nel nucleo organizzato in cromosomi, è duplicata prima della divisione cellulare, attraverso un processo noto come replicazione [1, 19, 20].

In questo contesto si sviluppa la terapia genica, la quale sfrutta i processi che portano l'informazione genetica alla sua codifica, per controllare e modulare l'espressione delle proteine, al fine di indirizzare le funzioni della cellula stessa. Infatti, tale tecnica prevede il trasferimento di uno o più geni sani in una cellula malata, al fine di curare una patologia causata dall'assenza o dal difetto di uno o più geni, presenti nel DNA del soggetto in esame. L'integrazione nel genoma permette infatti la replicazione del gene di interesse ed il suo trasferimento alle cellule figlie, derivanti dalla duplicazione della cellula madre. Per far ciò si ricorre a 3 diversi tipi di approcci: sostitutivo, inattivante o additivo. Risulta infatti possibile sostituire i geni mutati con copie di geni sani e funzionali; bloccare la sintesi, inibendo la trascrizione o traduzione, di un gene che funziona in modo improprio, silenziandolo; introdurre geni non presenti nel soggetto stimolando la sovra-espressione di proteine terapeutiche [1].

Gli aspetti cruciali della terapia genica riguardano: il tipo di somministrazione cui si ricorre, i sistemi utilizzati per realizzare il trasferimento del gene terapeutico e il metodo da adottare per effettuarlo.

La somministrazione del gene terapeutico

La somministrazione di geni per scopi terapeutici può essere eseguita *in vivo* o *ex vivo*. Nelle applicazioni *in vivo*, il *gene delivery* viene effettuato direttamente nel paziente all'interno del tessuto. Viene attuata in tutti quei casi in cui le cellule non possono essere messe in coltura, o prelevate e reimpiantate, come quelle del cervello o del cuore e della maggior parte degli organi interni. L'approccio *in vivo*, nel quale il gene d'interesse viene inserito nell'organismo tramite un opportuno vettore, direttamente per via locale o sistemica, rappresenta un modello terapeutico con elevata compliance e relativamente più economico degli studi *ex vivo* ma, attualmente, di più difficile applicazione [21]. Al contrario, nelle applicazioni *ex vivo*, è necessario il prelievo delle cellule somatiche della persona interessata. Queste, successivamente, vengono messe in coltura in laboratorio, trattate con il materiale genetico di interesse e reinfuse o reimpiantate nel corpo del soggetto. Questo approccio è applicabile solo a tessuti che possono essere estratti dall'organismo, alterati geneticamente e reintrodotti. Tale procedura è sicuramente la più lunga e la più costosa delle due ma permette di selezionare ed amplificare le cellule d'interesse ed inoltre gode d'una maggior efficienza [22].

I sistemi utilizzati per il trasferimento del gene terapeutico

Il materiale genico cui si ricorre per inserire il materiale di interesse, che risulta dipendente dall'approccio usato, è generalmente costituito da plasmidi o *small interference RNAs* (siRNA).

Nel caso di *gene delivery* non virale per l'inserimento di una copia corretta del gene o per l'introduzione di uno nuovo che codifica per una proteina terapeutica, l'elemento ausiliario è rappresentato, appunto, dal plasmide, una molecola circolare di DNA batterico extracromosomico a doppio filamento, in grado di duplicarsi indipendentemente da quello cromosomico. Questo filamento circolare di DNA risulta caratterizzato da diversi elementi: un sito di replicazione, che permette al plasmide di replicarsi in concomitanza dell'ospite; un sito multiplo di clonaggio (*polylinker*), riconosciuto dagli enzimi di restrizione che tagliano il DNA permettendo, tramite l'enzima ligasi (che catalizza la formazione di un

nuovo legame), l'inserimento di geni di interesse; un promotore, sito di riconoscimento per l'enzima RNA-polimerasi, che avvia il processo di trascrizione. Tali strutture consentono di inserire materiale esogeno d'interesse all'interno del plasmide stesso, che viene così modificato geneticamente, dando origine ai così detti plasmidi ricombinanti. Per poter inserire il materiale esogeno nel plasmide è necessario ricorrere agli enzimi di restrizione che, tagliando la doppia elica di DNA esogeno in corrispondenza di specifiche sequenze e trattando, al contempo, il plasmide con il medesimo enzima, permettono di ottenere estremità complementari che possono essere tra loro associate, grazie alla costituzione di legami covalenti promossi dall'enzima DNA ligasi [2, 23]

Un approccio alternativo per inibire l'espressione di una proteina consiste nel trasferimento di *small interfering RNA* (siRNA), molecola a doppio filamento coinvolta nel processo di silenziamento genico (*RNA interference*), mediante il quale alcuni frammenti di RNA sono in grado di interferire e inibire l'espressione genica. Il siRNA si associa ad un complesso enzimatico, chiamato RISC (*RNA-Interference Silencing Complex*), il quale degrada il doppio filamento prendendolo. Una delle due catene resta associata a RISC ed è così in grado di legarsi all'mRNA complementare presente nel citoplasma. Il filamento originato dalla loro associazione viene rapidamente degradato dalle RNasi della cellula (nucleasi che catalizzano l'idrolisi del RNA), impedendo così la traduzione del gene e di conseguenza la sintesi della proteina di interesse [2, 3].

I metodi utilizzati per il trasferimento del gene terapeutico

Negli ultimi decenni sono state sviluppate diverse strategie per il trasferimento di geni a cellule target, con l'obiettivo di modularne l'espressione a scopo terapeutico

Il metodo più intuitivo per il trasferimento di geni è la somministrazione diretta di acidi nucleici alle cellule. Sebbene questa tecnica rappresenti il modo più intuitivo e sicuro, si presenta applicabile solo a tessuti facilmente accessibili, risultando limitata anche a causa della rapida degradazione che il materiale genetico subisce da parte delle nucleasi sieriche, nonché inefficace a causa della dimensione elevata delle catene di DNA e della repulsione elettrostatica che si instaura tra acidi nucleici e membrana cellulare, essendo il DNA un biopolimero carico negativamente e la superficie cellulare costituita da una carica elettrostatica netta negativa [2, 3]. Per questo motivo, l'obiettivo principale della terapia genica è lo sviluppo di metodi e vettori in grado di facilitare l'ingresso del materiale genetico nella cellula, aumentando così l'efficienza di trasfezione.

In particolare, due sono gli approcci principali per favorire il trasferimento di geni alle cellule: i metodi fisici e i vettori chimici (virali o non virali).

I metodi fisici

I metodi fisici per la somministrazione di materiale genetico *in vitro* ed *in vivo* sfruttano forze fisiche per permeare la membrana cellulare, accentuando le dimensioni dei pori naturali della membrana stessa, entro cui risulta così più facilitata l'internalizzazione di materiale genico da parte della cellula. I più importanti ed utilizzati risultano essere l'elettroporazione, il “*Gene gun*”, gli ultrasuoni e l'iniezione idrodinamica. Il primo prevede l'applicazione di un campo elettrico controllato a cavallo della membrana, che da una parte determina un aumento della permeabilità della membrana stessa favorendo l'ingresso del materiale genico, ma dall'altra rischia di danneggiare il tessuto bersaglio. Nonostante tale svantaggio questa tecnica ha permesso di ottenere un'espressione genica duratura in tessuti quali pelle, muscoli e fegato [24, 25]. Il “*Gene gun*”, che mostra una penetrazione poco profonda del DNA nel tessuto, è caratterizzato dal bombardamento di tessuti o cellule con microparticelle rivestite di materiale genetico, permettendo la penetrazione del gene nel citoplasma o direttamente nel nucleo, bypassando il compartimento endosomico, responsabile dell'endocitosi [21]. Anche l'applicazione degli ultrasuoni mira ad incrementare la permeabilità della membrana cellulare, consentendo in questo modo l'ingresso del materiale genetico nelle cellule. Questo metodo si presenta flessibile e sicuro, mostrando un aumento dell'espressione genica quando combinato con microbolle, generate dall'assorbimento delle onde stesse, in tessuti vascolari e muscolari [23, 26]. L'iniezione idrodinamica infine sfrutta la pressione, permettendo una rapida iniezione di un elevato volume di acidi nucleici anche in organi interni, in modo particolare nel fegato [4].

In generale, dal momento che gli acidi nucleici di per sé non contengono proteine per legarsi a specifici recettori cellulari, l'utilizzo delle tecniche fisiche non permette al DNA “nudo” di essere selettivo per un determinato target cellulare. Per questo motivo, un primo limite di questo approccio è la necessità di somministrare il materiale genetico in prossimità stretta del sito target. Tutte queste metodologie risultano per tale ragione inappropriate per alcuni tipi di patologie, oltre che limitate in termini di efficacia e a causa dei costi consistenti.

I metodi chimici

Dal momento che il successo della terapia genica risulta strettamente legato al trasferimento del gene esogeno all'interno delle cellule specifiche e alla sua efficiente espressione, la fattibilità del ricorso a tale tecnica terapeutica sembra quindi dipendere dal continuo sviluppo di metodi adatti a consentire il *gene delivery* in modo indirizzato e selettivo. Per questo motivo, dalla somministrazione diretta di materiale genico tramite metodi fisici, si è sempre di più passati allo sviluppo di vettori per il trasporto dello stesso. Ad oggi, la principale sfida per la finalizzazione dell'utilizzo della terapia genica in clinica è costituita, perciò, dall'ingegnerizzazione di vettori appropriati, in grado di veicolare efficacemente gli acidi nucleici all'interno della cellula, mantenendo caratteristiche di biocompatibilità e immunocompatibilità. Per questa ragione, gli sforzi della ricerca si stanno focalizzando sul disegno di *carrier* in grado di compattare e proteggere l'oligonucleotide d'interesse.

I vettori comunemente usati in terapia genica sono virali o non virali e devono essere in grado di: proteggere gli acidi nucleici dalla degradazione ad opera del sangue e delle nucleasi interstiziali, promuovere l'internalizzazione di materiale genetico nelle cellule target e rilasciare il materiale genico, una volta all'interno della cellula, nel sito corretto. Un sistema di *gene delivery* deve essere sicuro sia per il paziente che per l'operatore, facile da usare e il meno costoso possibile.

Metodi chimici: la trasduzione

Inizialmente la ricerca si è concentrata sull'uso di *carrier* virali, come adenovirus, retrovirus, virus adeno-associati e lentivirus, per la loro capacità di veicolare DNA/RNA esogeno in numerose cellule di linea [5, 6]. Quando la terapia genica ricorre a questi organismi come vettori, il trasferimento di materiale genetico prende il nome di trasduzione. I virus sono entità biologiche caratterizzate da dimensioni nell'ordine dei nanometri, che si presentano come parassiti obbligati, non disponendo di tutte le strutture biochimiche e biosintetiche necessarie per la loro replicazione, e sfruttando, invece, quelle presenti nella cellula ospite in cui penetrano. Alcuni virus possono inserire fisicamente il loro genoma in quello dell'ospite in modo che sia replicato insieme ad esso. È quindi possibile, introducendo un transgene nel patrimonio genetico dell'organismo parassita, creare un vettore ricombinante e sfruttare le proprietà del virus stesso per veicolarlo con alta efficacia nelle cellule bersaglio [27]

Nonostante i vantaggi offerti dai vettori virali, primo tra i quali l'elevata efficienza di trasduzione, la loro applicazione *in vivo* risulta ostacolata dalla reazione del sistema immunitario umano, che riconosce e combatte i virus, riducendo così l'efficacia di questa tipologia di *carrier*. Questi vettori, inoltre, portano con sé altri limiti legati al rischio di mutagenesi e di ricombinazione, a una produzione complessa ed economicamente dispendiosa e alla ridotta quantità di informazione genetica introducibile al loro interno [5].

Metodi chimici: la trasfezione

Per tale ragione si sono ricercate alternative più semplici, sicure e meno costose, che però, almeno inizialmente, si sono rivelate meno efficaci, soprattutto per applicazioni *in vivo*. Il processo di trasferimento di materiale genetico all'interno delle cellule può essere, infatti, mediato anche da vettori non virali. In questo caso, tale operazione viene definita trasfezione e i *carrier*, a cui si ricorre, vengono denominati trasfettanti. Questi ultimi possono essere prodotti su larga scala, con costi accettabili, alta riproducibilità, presentandosi inoltre relativamente stabili all'immagazzinamento. Ciò che più conta risulta comunque essere la possibilità di somministrazione ripetuta senza o con bassa risposta immunitaria e la possibilità di trasporto di materiale genetico di dimensioni idealmente illimitate. Per questi motivi, i vettori non virali sono risultati elementi di interesse per la terapia genica, portando la ricerca scientifica dello scorso decennio ad incentrarsi sulla progettazione e il disegno di *carrier* cationici, in grado di formare complessi con il DNA e evitare le barriere cellulari, sia *in vitro* che *in vivo*, permettendo il *gene delivery* [2, 3, 8]. I vettori non virali sono molecole sintetiche o naturali, in grado di complessare gli acidi nucleici, grazie alle interazioni elettrostatiche che si ingenerano tra i gruppi fosfati degli acidi nucleici carichi negativamente e le molecole cationiche. Tali legami portano alla neutralizzazione della carica elettrica e alla condensazione in particelle micro o nanometriche, attraverso un processo di *self assembly*. I complessi così generati prendono il nome di lipoplessi [7, 28], quando i vettori appartengono alla famiglia dei lipidi, e poliplessi [8, 29], se appartengono alla seconda categoria principale di vettori non virali, quella dei vettori polimerici. La progettazione di tali vettori non virali è basata essenzialmente sulla necessità di bilanciare la stabilità del complesso con un facile rilascio degli acidi nucleici, in maniera da ottimizzare l'efficienza di trasfezione. Tale bilancio è fortemente influenzato da fattori quali il rapporto di carica (rapporto tra numero di cariche positive del complesso e numero di cariche negative del plasmide) e il pH di complessazione, dai quali dipende la natura delle molecole stesse e quindi la capacità di

formazione dei complessi. Fondamentale per una progettazione promettente di tali vettori risulta, inoltre, la conoscenza del processo di internalizzazione nella cellula compiuto dai vettori non virali, al fine di comprendere il meccanismo di consegna del materiale genico esogeno al nucleo della cellula. Tale processo non è ancora completamente noto, anche se, quello che risulta certo, è che questi vengono internalizzati nella cellula prevalentemente per endocitosi. I complessi interagiscono con la membrana plasmatica, destabilizzando la membrana endosomiale, tramite la riorganizzazione dei fosfolipidi che la costituiscono, e vengono assorbiti dalle vescicole intracellulari. Infatti, il processo di endocitosi avviene grazie all'interazione di natura elettrostatica tra le cariche positive del complesso e le cariche negative delle macromolecole presenti sulla superficie esterna della membrana cellulare, quali glicoproteine e proteoglicani. Una volta all'interno della cellula, i complessi si trovano in una struttura vescicolare detta endosoma, il cui cammino naturale si conclude con la fusione con un lisosoma, il quale racchiude enzimi in grado di idrolizzare i legami fosfodiesterici tra le subunità nucleotidiche degli acidi nucleici. Per evitare che l'idrolisi avvenga e garantire l'espressione genica è quindi necessario che il vettore non virale, o almeno il suo carico, riesca a fuoriuscire dall'endosoma prima che avvenga la fusione e la conseguente digestione enzimatica. Il meccanismo di fuoriuscita dall'endosoma risulta diverso in funzione del tipo di vettore. Per quanto riguarda i lipidi cationici è stato ipotizzato che questi interagiscano con i lipidi anionici, che costituiscono la membrana delle vescicole, determinando la neutralizzazione della carica elettrica. La conseguente rottura della vescicola determina il rilascio del materiale genico nel citoplasma cellulare. Diverso è il caso dei polimeri cationici che sfruttano la presenza di ammine secondarie e terziarie, maggiormente protonabili al pH acido che caratterizza l'interno del lisosoma. La membrana dell'endosoma, infatti, è caratterizzata dalla presenza di una pompa ATPasi che trasporta attivamente ioni H^+ dal citoplasma alla vescicola, allo scopo di riportarne il pH a valori fisiologici. L'ingresso di protoni provoca un afflusso di ioni Cl^- e H_2O nella vescicola stessa causandone il rigonfiamento e la conseguente lisi con rilascio del complesso nel citoplasma. In seguito al rilascio dall'endosoma, il *gene delivery system* deve essere trasportato a questo punto attraverso il citoplasma, ambiente metabolicamente ostile, contenente enzimi in grado di degradare gli acidi nucleici, ed entrare nel nucleo. Affinché il transgene possa essere espresso, il materiale genico esogeno deve entrare nel nucleo cellulare senza subire degradazione, in modo che possa avere inizio la trascrizione. La presenza del vettore consente di proteggere il materiale genico oltre che migliorarne la mobilità citosolica, permettendo una minore permanenza dello stesso nel

citoplasma. La diffusione passiva di macromolecole attraverso i pori nucleari è minima ed è tanto meno efficace quanto maggiori sono le dimensioni del filamento nucleotidico. È invece stato osservato che l'espressione del plasmide veicolato da cationi è più elevata nelle cellule in fase di mitosi. In fase proliferativa, perdendo l'integrità della membrana nucleare, l'ingresso del complesso risulta infatti più semplice e quindi le cellule sono più facilmente trasfettate. Un secondo meccanismo richiede invece la presenza di sequenze specifiche che mediano l'interazione del vettore con proteine, quali fattori di trascrizione, consentendo il trasporto attivo del complesso DNA-proteina all'interno del nucleo. Si tratta di un trasporto attivo energia-dipendente basato su Sequenze Segnale di Localizzazione Nucleare (NLS) [2, 3, 8].

I lipoplessi

Il primo gruppo di vettori non virali è costituito dai lipoplessi [7, 28]. I lipidi sono molecole organiche anfifiliche, contenenti un gruppo idrofobico e uno polare. La formazione di lipoplessi tra acidi nucleici e lipidi anionici o neutri risulta molto complessa, in quanto il DNA non viene incorporato spontaneamente negli aggregati lipidici. Questo ha portato l'attenzione della ricerca scientifica a focalizzarsi sui lipidi cationici, che instaurano interazioni elettrostatiche con il DNA generando i complessi grazie all'aumento di entropia in gioco nel processo. Usati come trasfettanti, questi sono composti da tre domini che ne determinano le più importanti proprietà chimico-fisiche, influenzandone la citotossicità e efficacia di trasfezione. Il dominio idrofobico è costituito generalmente da una o più catene alifatiche o da una struttura policiclica basata su derivati del colesterolo (un lipide naturale facilmente metabolizzato dal corpo), che portano ad un aumento di efficienza di trasfezione con il diminuire della lunghezza e con l'aumentare del grado di saturazione. Il secondo dominio è rappresentato da una o più teste polari cariche positivamente, che risultano le principali responsabili della tossicità del lipide, e sono in grado di interagire con il DNA, determinandone la condensazione in lipoplessi. L'ultimo, il *linker* di connessione, governa l'orientazione relativa della testa polare e della catena idrofobica, influenzando la flessibilità della molecola, il grado di stabilità chimica, la biodegradabilità e di conseguenza l'efficienza di trasfezione del complesso lipide/DNA. I lipidi cationici risultano vettori molto promettenti per la terapia genica proprio grazie alla loro affinità con la membrana cellulare e alla formulazione altamente controllata e purificata. Inoltre, a differenza dei *carrier* virali, sono in grado di complessare materiale genetico di elevate dimensioni ed essere funzionalizzati con ligandi recettore-specifici per

il riconoscimento. La loro applicazione *in vivo* risulta però limitata, a causa dell'instabilità dei complessi stessi in presenza di proteine del siero. In tali condizioni i lipoplessi possono, infatti, subire variazioni dimensionali e di carica superficiale, che compromettono i complessi stessi.

I poliplessi

Anche i vettori polimerici o poliplessi [29, 30] sono basati principalmente su *carrier* cationici, privi però di domini idrofobici e che portano ammine protonabili come le poli(etilenimine) (PEI), il chitosano, i dendrimeri, i polipeptidi e gli oligopeptidi cationici.

I PEI sono polimeri altamente versatili, sintetizzabili in un ampio *range* di pesi molecolari e derivatizzabili con specifici gruppi funzionali per migliorare le proprietà chimico-fisiche e biologiche dei complessi polimero/DNA. I gruppi amminici primari, presenti lungo le terminazioni delle catene, a pH fisiologico risultano protonati e assumono, quindi, cariche positive che permettono l'interazione elettrostatica con il DNA, a seguito della quale si crea il complesso. Le ammine secondarie e terziarie presenti nei PEI ramificati conferiscono inoltre capacità tamponante, dando origine all'effetto *proton-sponge*, che favorisce la fuoriuscita dei poliplessi dalle vescicole endosomiali in seguito all'internalizzazione dei complessi da parte della cellula. Per contro, l'alto quantitativo di cariche positive e la non-biodegradabilità dei polimeri in questione possono determinare un alto livello di tossicità.

Il chitosano è un polisaccaride lineare biodegradabile derivante dalla deacetilazione della chitina. A seconda del peso molecolare e del grado di deacetilazione, che ne influenzano la natura cationica, questo polimero è in grado di formare complessi di varie dimensioni con il DNA, proteggendolo efficacemente dalla degradazione enzimatica.

I dendrimeri sono polimeri sferici ad alto grado di ramificazione, caratterizzati da un *core* centrale da cui si dipartono, in modo ordinato e simmetrico, *bracci* altamente ramificati a costituire una struttura tridimensionale. Tra i dendrimeri ci sono poliammine, poliammidi e poliesteri ma il più comunemente utilizzato come *gene delivery system* è la poliamidoammina(PAMAM). Le ammine primarie, presenti sulla superficie esterna, partecipano alla condensazione del DNA e ne promuovono l'internalizzazione, le ammine secondarie e terziarie, poste all'interno della struttura, promuovono l'effetto *proton-sponge* nel meccanismo di rilascio del vettore. All'aumentare del numero di gruppi amminici

primari, e quindi di ciascuna generazione del dendrimero, si hanno legami più stabili con il materiale genico, però, si ha anche un aumento della densità dei gruppi cationici, che porta ad una maggiore tossicità.

Tra i polipeptidi cationici, le poli(L-arginine) sono polimeri lineari caratterizzati dalla presenza dell'arginina, amminoacido polare basico a causa del gruppo guanidinico che caratterizza la sua catena laterale. L'elevata citotossicità e la forte attivazione del sistema del complemento, dovuti alla carica superficiale di tali poliplessi, ne ha tuttavia precluso l'applicazione clinica. Altri polipeptidi lineari sono le poli(L-istidine), caratterizzate da un gruppo imidazolico che, a pK pari a 6, porta l'istidina a esser carica positivamente in soluzioni debolmente acide. Questa caratteristica fa sì che la membrana lipidica degli endosomi, che internalizzano tali poliplessi, si destabilizzi e i vettori siano così in grado di mediare il rilascio del materiale genico nel citoplasma. Le poli(L-lisine) (PLL) sono, infine, polipeptidi lineari che presentano buone caratteristiche di biodegradabilità, con indubbi vantaggi per il loro utilizzo *in vivo*. A pH fisiologico sono cariche positivamente, potendo dare origine ad una struttura in grado di condensare il DNA, neutralizzando la carica negativa dei gruppi fosfato, ma priva di potere tamponante ai fini del rilascio dell'endosoma. In generale, il principale vantaggio associato a tali polipeptidi cationici è, quindi, la possibilità di funzionalizzare la catena poliamminoacidica con agenti endosomolitici, ligandi specifici o peptidi fusogenici al fine di migliorare le prestazioni del vettore risultante [8, 29].

L'ultimo gruppo è rappresentato dagli oligopeptidi, costituiti da un limitato numero di amminoacidi legati tra loro per mezzo di legami ammidici, che conferiscono ottime caratteristiche di biodegradabilità. Il loro processo di sintesi può essere facilmente controllato e sono possibili infinite combinazioni di amminoacidi nella catena peptidica, per cui risulta possibile progettare e costruire sequenze con proprietà modulabili in funzione delle specifiche applicazioni. Questi peptidi a basso peso molecolare risultano relativamente stabili, facili da funzionalizzare, meno tossici e immunogenici se confrontati con altri vettori virali e non, in quanto deboli attivatori del sistema del complemento. Si deduce da queste osservazioni che il vantaggio principale per i vettori polimerici cationici in generale risiede quindi nella possibilità di ottimizzarne la struttura chimica per l'uso desiderato, selezionando il peso molecolare, il grado di ramificazione e la densità di carica o accoppiandoli con ligandi specifici per la cellula bersaglio. Questi vettori rappresentano, proprio per questa ragione, una prospettiva promettente. Oltre a proteggere il DNA da agenti aggressivi, sia chimici che enzimatici, e da radiazioni ionizzanti, i polipeptidi,

infatti, possono tramite queste modifiche aumentare la propria efficienza di consegna e la loro biocompatibilità.

Lo sviluppo di vettori non virali, iniziato più di due decenni fa, ha portato quindi ad identificare e modificare, al fine di ottimizzarne le proprietà, alcune importanti classi di molecole. Tuttavia, la strada verso l'obiettivo finale di consegna del gene, cioè l'espressione della proteina o il silenziamento genico, è piena di ostacoli, in quanto i vettori non virali attuali mostrano ancora mancanze circa la loro efficienza complessiva [1, 9]. Per questa ragione, il futuro del *gene delivery* non virale si basa sullo sviluppo di vettori multifunzionali e piattaforme adeguate per indirizzare efficacemente il materiale genetico alle cellule bersaglio in modo sicuro e controllato. Tali studi sono indirizzati soprattutto verso lo sviluppo di vettori polimerici, in quanto la loro stessa struttura permette modifiche che possono aumentarne l'efficienza di consegna e la loro biocompatibilità. Il diverso peso molecolare e la possibilità di derivatizzarli con specifici gruppi funzionali possono migliorare le proprietà chimico-fisiche e biologiche dei complessi polimero/DNA, piuttosto che la capacità di rilascio dei poliplessi dalle vescicole endosomiali. Trovare la combinazione migliore risulta, però, un lavoro complesso, se svolto con tecniche tradizionali. Si tratta di operazioni manuali eseguite su larga scala, che permettono di ottenere un'efficienza calcolata in maniera statistica su popolazioni a volte disomogenee di cellule. Per risolvere tali limiti è necessario sviluppare una tecnologia *high throughput*, che permetta di velocizzare tali operazioni, ottenendo risposte precise. Serve una tecnica che sia in grado di monitorare molte condizioni in maniera veloce e automatica, passando da un approccio statistico ad uno deterministico di tipo on/off. Tale tecnica è quindi in fase di ottimizzazione con lo scopo di definire un protocollo di *gene delivery* biocompatibile, immunocompatibile ed efficace che si presenti adatto all'applicazione clinica [9].

1.2. I vantaggi della microfluidica

In questo contesto, la crescita in campo microfluidico crea nuove prospettive per la terapia genica e il *gene delivery*, offrendo uno strumento indirizzato all'automatizzazione delle operazioni e all'incremento dell'efficienza dei risultati. Le procedure tradizionali nel campo del *gene delivery*, come nella maggior parte delle applicazioni biologiche, richiedono, infatti, operazioni manuali spesso complesse e lunghe, che mostrano mancanze

in termini di accuratezza e specificità, risultando caratterizzate, nel caso specifico, da bassi valori di vitalità cellulare e efficienza di trasfezione [10].

La microfluidica [31, 32], ambito innovativo e tutt'ora in via di sviluppo, coinvolge sistemi che processano e manipolano piccole quantità di fluido ricorrendo all'uso di canali di dimensioni micrometriche. È proprio questa la peculiarità che la differenzia dalla teoria fluidodinamica convenzionale. La validità dell'approssimazione di continuità, anche in scala microscopica, permette di sfruttare i principi della meccanica dei fluidi classica per lo studio dei dispositivi microfluidici. Tale approssimazione risulta molto importante dal punto di vista computazionale, in quanto permette di analizzare solo i valori medi dei parametri che caratterizzano il moto di un fluido, trascurando così le più complesse interazioni tra le molecole del fluido stesso, presenti nella formulazione di Navier Stokes. Nel dettaglio, le limitate dimensioni dei canali comportano una dinamica dei fluidi al loro interno caratterizzata da moto di tipo laminare, che avviene con scorrimento di strati infinitesimi di fluido gli uni accanto agli altri, senza alcun tipo di rimescolamento tra i diversi livelli. Questo è dimostrato da un'analisi del numero di Reynolds (Re) alla microscala, gruppo adimensionale proporzionale al rapporto tra le forze d'inerzia e le forze viscosive:

$$Re = (vD\rho) / \mu$$

Con v =velocità [m/s]
 D =diametro [m]
 ρ =densità [Kg/m³]
 μ =viscosità [Pa·s]

Da un'analisi dimensionale è infatti possibile osservare che, essendo il numeratore caratterizzato dal prodotto di una grandezza dell'ordine di 10^{-6} (il diametro del canale in μm moltiplicato per una velocità che, solitamente, per le applicazioni biomedicali, non eccede i 10^{-3} mm/s), il flusso a questa scala dimensionale si distingue per un numero di Reynolds che può essere estremamente basso. Tale specifica ha trovato applicazione nell'ambito delle analisi di laboratorio, riscontrando un successo sempre più ampio, permettendo un controllo spazio-temporale nella manipolazione dei fluidi difficilmente replicabile alla macroscala con tecniche tradizionali.

Nel suo decorso, la microfluidica ha influenzato oltre ai metodi microanalitici che, con l'approccio capillare, hanno rivoluzionato le analisi chimiche, anche lo studio dei

fondamentali fenomeni biologici [33]. Proprio in tale campo le tecniche di microscala trovano attuazione in applicazioni quali: analisi della singola cellula, tecniche di citometria a flusso, sviluppo di piattaforme diagnostiche, studi nel campo dell'ingegneria tissutale e analisi più tradizionali come la coltura cellulare [34]. È in questo contesto che si sono sviluppati i cosiddetti *Lab-on-a-Chip* (LOC), dispositivi in grado di integrare funzioni multiple, che si possono svolgere in laboratorio, su un singolo chip con dimensioni che variano da pochi millimetri a qualche centimetro quadrato. Questa nuova tecnologia ha migliorato i fondamentali processi di manipolazione dei fluidi, che si esplicano principalmente nella possibilità di separare, ordinare e miscelare uno o più fluidi al fine di rendere possibili analisi ed esperimenti sugli stessi. Accanto a tale realtà, si fa largo, nel corso degli anni, la possibilità di integrare i sistemi microfluidici con ulteriori dispositivi quali valvole, pompe e miscelatori, che consentono un controllo più efficace del flusso dei fluidi all'interno del sistema stesso, migliorando, in questo modo, le prestazioni in analisi chimiche e biologiche, nonché aumentando l'efficacia nella realizzazione di sistemi fisiologici cellulari in vitro [19].

La miniaturizzazione delle grandezze in gioco rappresenta un importante passo verso un miglior controllo dei processi eseguibili, grazie ad una più veloce risposta del sistema, e permette alle già esistenti analisi di essere realizzate su campioni significativamente più piccoli. Infatti, le ridotte grandezze che caratterizzano il dispositivo consentono un minor consumo di volumi di fluido in gioco, beneficio traducibile in una evidente e consistente riduzione dei costi. Grazie all'utilizzo di tale tecnologia è, inoltre, possibile l'acquisizione simultanea di vaste quantità di informazioni in un unico esperimento, grazie all'implementazione di approcci di tipo *high-throughput*. Ne consegue una maggiore efficienza, nonché alta risoluzione e precisione delle analisi. A questo, si accompagna la possibilità di una produzione dei dispositivi di tipo industriale, che comporta un'ulteriore diminuzione dei costi di fabbricazione. È evidente quindi che il potere della miniaturizzazione risiede non solo nella realizzazione di un'economia di scala, ma anche nello sfruttamento delle insolite proprietà fisiche del flusso e del trasporto di massa a livello microscopico, al fine di realizzare precise ed efficienti analisi non accessibili macroscopicamente [31].

I dispositivi LOC, grazie a dimensioni caratteristiche comparabili alla grandezza media di una cellula e dell'ambiente extracellulare, risultano poi particolarmente idonei allo studio di cellule e al monitoraggio del comportamento cellulare, attraverso strade difficilmente

percorribili in precedenza. La capacità di indirizzare cellule verso precise configurazioni spaziali e di manipolare il flusso di fluidi e particelle (quali vettori genici, farmaci o fattori di crescita) all'interno di canali microfluidici permette un controllo spazio temporale senza precedenti delle risposte cellulari a determinati stimoli. Questo fa della microfluidica un potente strumento per la rapida ottimizzazione di specifici protocolli attraverso l'utilizzo di minime quantità di cellule e reagenti.

Queste caratteristiche rendono l'approccio microfluidico particolarmente adatto allo studio e all'ottimizzazione di tecniche di trasfezione cellulare [10, 11]. Il ricorso a canali di dimensioni micro e nanometriche permette, infatti, di aumentare il controllo spazio-temporale sulle cellule target, sul materiale genetico esogeno, sullo stimolo che si utilizza per effettuare il processo di trasfezione, oltre che sull'ambiente in cui questi elementi interagiscono. L'implementazione dei tradizionali metodi di trasfezione fisica non virale, come elettroporazione, microiniezione e trasfezione ottica, su sistemi microfluidici ha permesso di raggiungere una maggiore precisione, più alta efficienza di trasfezione e vitalità cellulare. Tali attestazioni sono state evidenziate in diversi articoli presenti in letteratura [10, 11, 35, 36]. Più recente è l'utilizzo di piattaforme microfluidiche per l'ottimizzazione delle tecniche di trasfezione tramite vettori non virali, sia nel campo della produzione di vettori alla microscala che nell'ambito del delivery vero e proprio di tali fattori a cellule target, con lo scopo di valutarne l'efficienza di trasfezione in maniera *high-throughput*.

1.2.1 Analisi di singola cellula

I dispositivi microfluidici offrono, tra le altre, la possibilità di condurre analisi di singola cellula. Questa capacità di analizzare il comportamento di una cellula isolata dalle altre potrebbe agevolare la comprensione di molti processi biologici, portando a risultati deterministici non più basati sull'andamento stocastico tipico di popolazioni cellulari eterogenee. Le comuni linee guida per le tecniche di analisi di singola cellula prevedono l'uso di strumenti biocompatibili, trasparenza, accessibilità cellulare in termini di manipolazione, stabilità, sensibilità e capacità di mimare le condizioni presenti in vivo oltre a puntare ad ottenere analisi accurate in modo efficiente [37].

I metodi tradizionali

Il metodo più comunemente usato per l'analisi singola cellula è la citometria a flusso (FC), che permette di analizzare centinaia di migliaia di singole cellule per minuto secondo la loro dimensione, granularità e fluorescenza. La ragione del suo successo è la velocità combinata con la marcatura fluorescente, che permette, per esempio, la determinazione semi-quantitativa dei livelli di proteina presenti in una popolazione di cellule o il campionamento di cellule a diversi *time point*. Tuttavia, non è possibile seguire le stesse singole cellule nel tempo e tale metodo non risulta progettato per la movimentazione, la manipolazione e l'analisi dinamica delle singole cellule, né per l'osservazione della localizzazione spaziale della fluorescenza all'interno di una cellula [38]. La microscopia è un altro metodo frequentemente usato per analisi di cellula singola in studi dipendenti dal tempo. L'ottenimento di centinaia di immagini in modo rapido richiede tuttavia lunghe analisi di *post processing* delle immagini per estrarre informazioni utili sulle cellule e la loro composizione intracellulare. Esempi di altre tecniche per l'analisi di singole cellule sono citometria a scansione laser (LSC), che permette l'*imaging* e analisi quantitativa di singole cellule in tessuti in situ, elettroforesi capillare (CE), per la separazione efficiente e la detenzione di cellule intere o campioni subcellulari e microdissezione laser (LCM), per separare singole cellule dal tessuto per ulteriori analisi [39]. Ciò che emerge è che i tradizionali metodi che consentono lo studio di singola cellula sono limitati dai costi, dalla capacità di trattamento dei dati richiesta per esaminare un largo numero di cellule e dalle difficoltà associate all'analisi di piccole quantità di materiale iniziale [37].

I metodi innovativi

L'approccio microfluidico risulta adatto a risolvere tali problemi assicurando maggiore sensibilità, automazione e una scala di analisi più economica [40]. Le ragioni che focalizzano l'attenzione sui sistemi microfluidici in questo contesto sono molteplici: il crescente interesse nelle analisi e sperimentazioni biochimiche di singole cellule viventi, per studiare ad esempio l'effetto di un farmaco o di uno stimolo esterno; la possibilità di integrare tutte le operazioni analitiche standard sul dispositivo stesso; l'opportunità di sfruttare simultaneamente diversi metodi per la manipolazione cellulare; la comparabilità dimensionale tra cellule e dispositivi utilizzati; la possibilità di eseguire analisi dinamiche in tempo reale di singola cellula vivente.

Primo *step* critico per l'implementazione di dispositivi per lo studio e la manipolazione di singola cellula è lo sviluppo di un metodo riproducibile, che consenta il posizionamento delle cellule in una precisa locazione per permetterne l'analisi. Idealmente tali tecniche dovrebbero essere in grado di manipolare le cellule senza perturbarle utilizzando metodi citocompatibili e facilmente implementabili. Tra i principali approcci sviluppati si identificano: generazione e sfruttamento di flusso e focalizzazione idrodinamica; incorporazione delle cellule in gocce; trappole ottiche e optoelettroniche; trappole dielettroforetiche; trappole magnetiche; trappole meccaniche basate su geometrie particolari [12, 13, 41, 42].

Il primo approccio di focalizzazione idrodinamica (Figura 1.1.) sfrutta il basso numero di Reynolds dei fluidi che circolano nei sistemi microfluidici (generalmente minore di 0.1), condizione che garantisce flussi sviluppati all'interno dei canali caratterizzati da un regime laminare. Tale condizione è impiegata per trasportare le cellule lungo tutto il percorso microfluidico e, ad esempio, focalizzarle idrodinamicamente entro una regione ristretta o a livello di un'intersezione, per sondarle otticamente ed eseguire analisi di citometria a flusso, piuttosto che lisarle elettricamente o chimicamente e iniettare materiali fluorescenti per consentirne l'analisi. Il metodo più comune, che sfrutta il flusso idrodinamico, prevede la costruzione di un canale laterale, rispetto a quello principale di trasporto, di dimensioni sufficientemente ridotte da consentire l'intrappolamento della cellula per suzione [13, 43, 44].

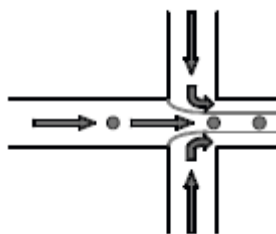


Figura 1.1- Schema rappresentativo di un dispositivo di intrappolamento singola cellula che si basa sulla focalizzazione idrodinamica. Le cellule sono indirizzate a livello di un'intersezione e focalizzate entro una regione ristretta che le costringe a proseguire il percorso lungo il medesimo filetto di fluido. Le frecce indicano la direzione seguita dal flusso [13].

Un altro approccio sfrutta le dimensioni ridotte dei canali e il flusso laminare in essi generato per lo sviluppo di varie tecnologie basate sulla generazione di gocce immiscibili entro cui incorporare singole cellule, consentendone il confinamento e la successiva analisi (Figura 1.2). L'incapsulamento di singole cellule all'interno delle microgocce è assicurato

e facilitato da trappole ottiche. I grossi vantaggi offerti da tali tecniche sono identificabili nella capacità di rapida detenzione delle molecole, legata al ristretto volume che circonda ogni cellula incapsulata, nell'alto potenziale mostrato nello *screening* dei dati in uscita, nell'amplificazione della detenzione di bassi livelli, ad esempio, di molecole marker e perciò nella maggiore sensibilità. Queste tecniche, inoltre, beneficiano del ridotto rischio di contaminazione dovuto alla presenza di una microcamera individuale, entro cui la cellula è racchiusa [13, 14].

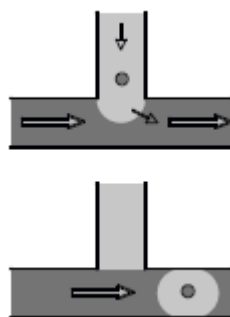


Figura 1.2- Schema rappresentativo di un dispositivo di intrappolamento singola cellula che si basa sulla incorporazione di cellule in gocce immiscibili. Il dispositivo consta di una stretta intersezione a T che facilita la formazione di gocce di piccole dimensioni. La freccia di dimensioni inferiori indica la direzione della cellula, quella di dimensioni maggiori indica la direzione del fluido[13].

È inoltre possibile ricorrere a metodi che sfruttano campi elettrici ad alta frequenza in grado di muovere le cellule verso zone specifiche tramite il collocamento di elettrodi (trappole dielettroforetiche, figura 1.3) o usando pattern di luce che cambiano la conduttività della superficie (trappole ottiche e optoelettroniche). Tra le diverse tecniche di manipolazione sopra citate, queste risultano particolarmente adatte alla miniaturizzazione per la loro semplice generazione e strutturazione alla microscala, portando vantaggi in termini di velocità, flessibilità, controllo, facile applicazione e automazione. A seconda della natura della bioparticelle in esame, possono essere applicati diversi tipi di campi elettrici: campi in corrente continua per l'elettroforesi di particelle cariche; campi non uniformi in corrente alternata per la dielettroforesi di particelle polarizzabili; la combinazione dei due per la manipolazione di particelle cariche e neutre. In particolare, la manipolazione ottica ha assunto notevole interesse grazie ai processi di non contatto e liberi da contaminazioni che la caratterizzano. Grazie ai vantaggi offerti dalle trappole ottiche (*optical tweezer*), queste possono essere facilmente combinate con sistemi microfluidici per la manipolazione delle cellule, legate a sfere dielettriche e in seguito

catturate nel punto focale di un fascio laser. Va tenuto in considerazione il fatto che la manipolazione prolungata in piccoli volumi può rappresentare un problema, in quanto l'assorbimento dell'energia laser in ambiente acquoso potrebbe condurre a un riscaldamento dannoso per le cellule, che rende questa tecnologia non applicabile a contesti di coltura cellulare [13, 41].

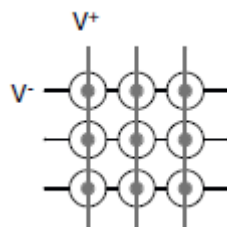


Figura 1.3- Schema rappresentativo di un dispositivo di intrappolamento singola cellula che si basa sull'uso di trappole dielettroforetiche. I campi elettrici ad alta frequenza creano forze che muovono le cellule verso gli elettrodi circolari imponendo loro un posizionamento specifico[13].

Altri metodi prevedono l'attacco selettivo di particelle magnetiche alle cellule, per la loro separazione e purificazione all'interno di un sistema microfluidico. Comunemente si ricorre a particelle super-paramagnetiche di diametro pari a 10-100nm, in modo che queste si adattino alle cellule senza avere effetti sulle loro funzioni e sulla loro vitalità. Un gradiente magnetico, generato con diversi metodi, può essere sfruttato per catturare le particelle e di conseguenza le cellule ad esse legate, in virtù dell'innata anisotropia magnetica delle particelle paramagnetiche. L'alta specificità ed efficienza del metodo magnetico fa sì che questo risulti adatto ad applicazioni che prevedono manipolazione di globuli rossi [14, 41].

Anche la stessa natura del materiale con cui è realizzato il substrato microfluidico porta a sviluppare altri metodi di confinamento cellulare. Le proprietà elastomeriche del PDMS lo rendono funzionale all'integrazione di valvole peristaltiche per un diverso numero di operazioni, tra le quali spicca, appunto, l'isolamento di una singola cellula. Ricorrendo a substrati realizzati in tale materiale, è possibile incorporare nel dispositivo ulteriori elementi, come microcolonne (*pillar*, figura 1.4b), microcamere, filtri, dighe o ostacoli (Figura 1.4a), in grado di intrappolare le cellule all'interno di una regione specifica in virtù delle loro dimensioni. La separazione delle cellule all'interno di microcanali può essere quindi raggiunta attraverso la manipolazione meccanica del target cellulare, tramite la fabbricazione di strutture di costrizione di vario tipo [45-51].

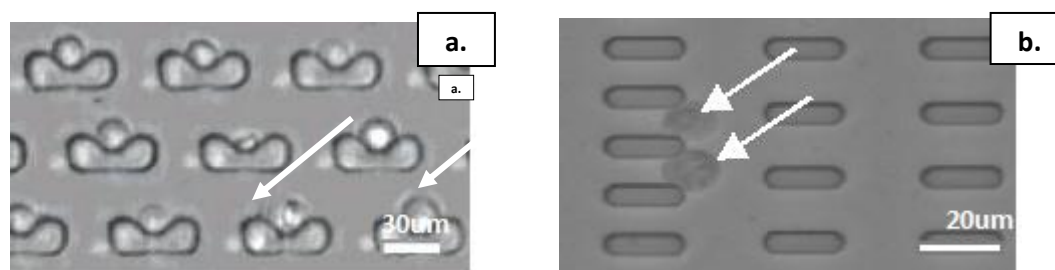


Figura 1.4- Immagini di microscopia che rappresentano due esempi di intrappolamento singola cellula conseguiti tramite geometrie particolari: **a)** dighe **b)** pillar. In evidenza le cellule intrappolate[49, 51].

Tra i diversi articoli presenti in letteratura, che analizzano i metodi appena presentati, emergono studi recenti che, per ottenere la cattura di una singola cellula, sfruttano, invece, una variazione di resistenza idraulica ottenibile all'interno di un LoC, in seguito all'intrappolamento cellulare. Questo approccio, si basa, in generale, sul progetto di un circuito microfluidico caratterizzato da una geometria e dimensioni tali da convogliare la sospensione cellulare in una direzione preferenziale, ove avviene l'intrappolamento. Il meccanismo di cattura stesso causa un cambio di resistenza passivo, tale da variare la traiettoria delle cellule successive a quella intrappolata, così che queste non vengano anch'esse intrappolate nel medesimo luogo. Si realizza così l'isolamento di una singola cellula.

Questo approccio di variazione passiva della resistenza idraulica per l'intrappolamento di singole cellule è stato ampiamente analizzato e caratterizzato nel lavoro di Lawren et al. [46]. Il disegno (Figura 1.5) del dispositivo è stato elaborato in modo tale da stabilire diverse resistenze lungo la sezione di una serpentina (canale principale) che porta il fluido a scorrere preferenzialmente lungo un canale di connessione posto tra due curve adiacenti del canale principale, ma solo in assenza di particelle o cellule catturate in esso. Dopo che una particella (2-20 μm diametro) o una cellula (2-10 μm diametro) trasportata lungo la serpentina è stata forzata a entrare nel canale di connessione, la traiettoria dominante del flusso risulta quella determinata dal canale principale, fino al raggiungimento della successiva trappola. Lo studio di tre diverse generazioni di dispositivi e trappole di diversa forma (triangolare, quadrata, conica ed ellittica), con profondità variabile tra 25 μm e 10 μm , ha permesso di raggiungere alti livelli di efficienza in termini di cattura di singola cellula per trappola, utilizzando velocità ed entro tempi che consentono un'ottima vitalità cellulare.

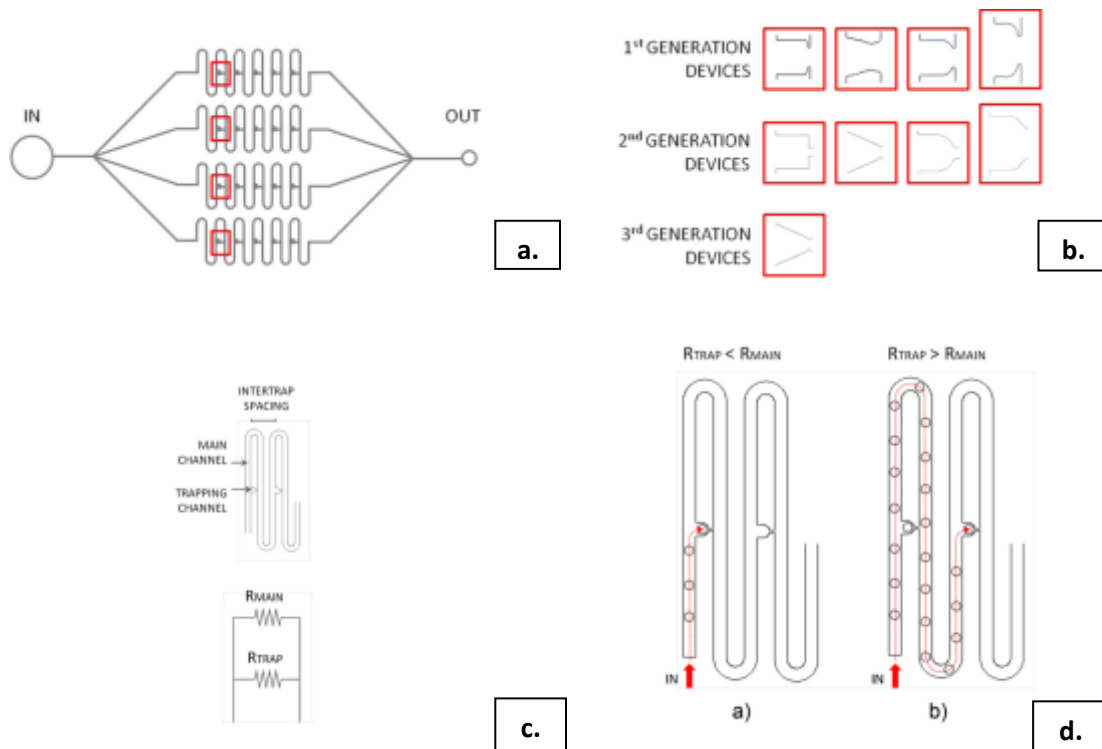


Figura 1.5- *a)* Schema del circuito provvisto di array di cattura di singola cellula; in evidenza le trappole *b)* tre generazioni di trappole utilizzate *c)* equivalente elettrico del dispositivo per spiegare il meccanismo di intrappolamento idrodinamico di singole cellule *d)* (a) modalità di cattura (b) modalità bypassaggio [46].

Lo stesso principio di funzionamento è sfruttato nel dispositivo realizzato da Yamaguchi et al. (Figura 1.6) [52], caratterizzato da due canali (quello principale dove scorre la sospensione cellulare e un *buffer* dove scorre il vettore di flusso), tra loro connessi da un terzo molto più stretto, e da una cavità semicilindrica di raccolta, posta nel punto in cui il canale principale e quello di scolo si incontrano. Il flusso all'interno del canale di scolo, prodotto dalla differenza di velocità esistente tra il fluido nel canale principale e quello nel canale *buffer*, realizza l'isolamento di una singola cellula (15 μm) nella cavità predisposta (100 μm diametro), grazie alla ridotta resistenza all'interno del canale. Quando la cellula viene catturata, questa blocca il canale di scolo, aumentandone la resistenza e costringendo le altre cellule a scorrere lungo il canale principale, depositandosi nella cavità successiva. Questo dispositivo, usato con successo per l'isolamento non invasivo e la coltivazione a lungo termine di singole cellule, apporta un contributo significativo in varie analisi biologiche, come la biopsia, bionalisi non invasive e studi della morfologia di singola cellula.

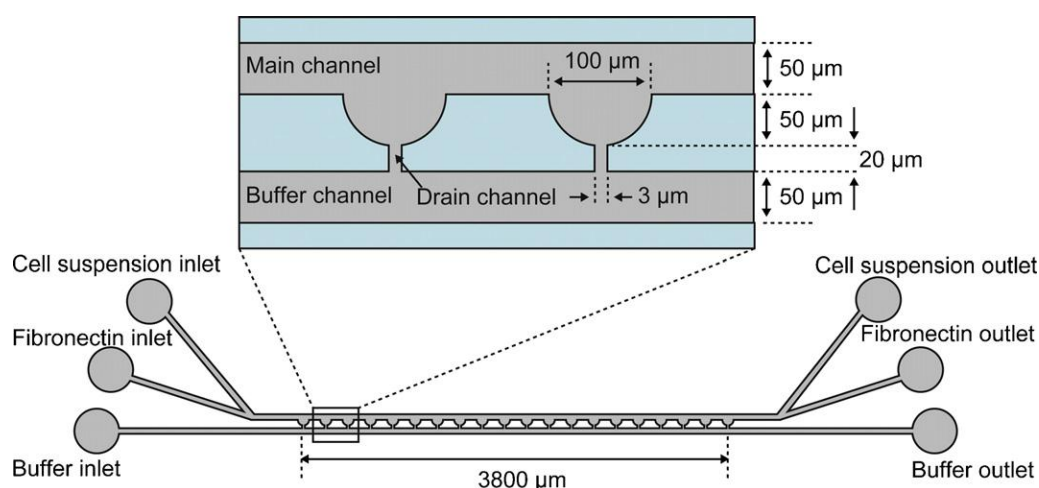


Figura 1.6- Illustrazione schematica del microchip multifunzionale caratterizzato da canale principale e canale di buffer, collocati parallelamente l'un l'altro. Il canale principale ha due ingressi per iniettare la sospensione cellulare e la soluzione fibronectina in modo indipendente, per realizzare una modificazione superficiale localizzata. Le 20 microcamere per la cattura non invasiva delle cellule sono situate nelle connessioni tra i due microcanali e il canale di scolo. In evidenza il dettaglio delle camere, poste tra i due canali principali e di buffer, con il rispettivo canale di scolo posto alla base. [52]

Questi principi sono stati implementati nel dispositivo progettato da Hong et al. (Figura 1.7), che, sfruttando lo stesso meccanismo di funzionamento descritto in precedenza, fa sì che ogni singola cellula sia direzionata verso una camera (400 μ m diametro) di coltura individuale, dove viene intrappolata da una piccola giunzione (3 μ m) posizionata nella parte sottostante la trappola [15]. Il meccanismo di intrappolamento aumenta la resistenza nella camera, prevenendo l'entrata di una seconda cellula, che viene così indirizzata alle camere a valle. Durante l'incubazione, le cellule generalmente migrano lontano dalla giunzione, riattivando in questo modo la trappola stessa. A questo punto, un secondo tipo cellulare può essere caricato attraverso il medesimo meccanismo. Basandosi su questo semplice metodo caratterizzato da *step* successivi, possono essere studiate diverse combinazioni di tipi cellulari e analizzata la comunicazione cellula-cellula. L'intrappolamento viene in questo caso implementato all'interno di un dispositivo più complesso che permette *screening high-throughput* di fattori di crescita, grazie alla presenza di un generatore di gradiente lineare a valle delle camere di coltura. Il dispositivo è in particolare costituito da 8 array di trappole e camere di coltura indipendenti, collegate ognuna ad un'uscita del gradiente. Il dispositivo si dimostra una piattaforma utile per capire nel dettaglio e in modo quantitativo la complessità del meccanismo di

comunicazione cellulare, nonché i suoi effetti sul comportamento cellulare in una varietà di sistemi biologici. Tale studio fornisce e assicura elevata efficienza, viabilità e permette osservazioni a lungo termine minimizzando le restrizioni fisiche.

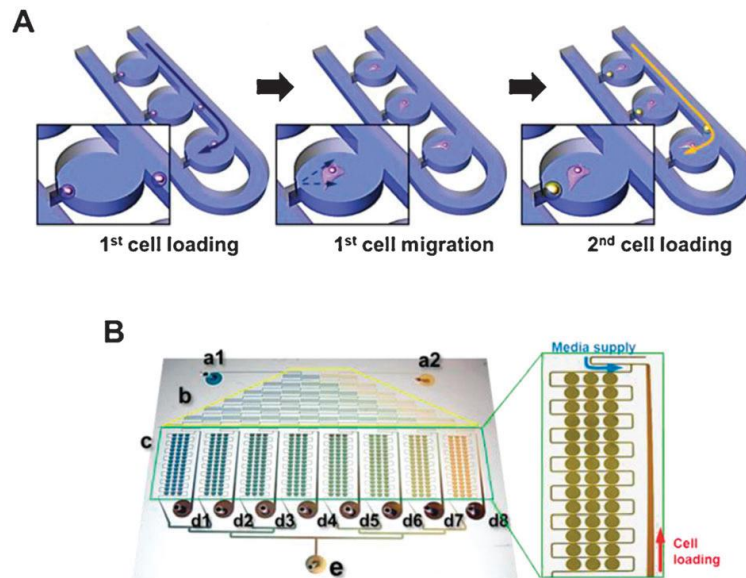


Figura 1.7- Rappresentazione: **a)** dell'unità base e delle fasi di immissione della sospensione cellulare e intrappolamento (1^{st} cell loading), migrazione della cellula precedentemente intrappolata (1^{st} cell migration) seconda cellula catturata (2^{nd} cell loading) **b)** del dispositivo nel completo: 2 ingressi (a1, a2), un generatore di gradiente (b), un array di camere di coltura (c), zone di raccolta cellule (da d1 a d8) e un'uscita per il waste (e). [15]

1.3 Obiettivo del lavoro

In questo contesto si colloca il presente lavoro di tesi, che mira a realizzare un sistema microfluidico in grado di ottimizzare tecniche di trasfezione non virale, con lo scopo di valutarne l'efficienza di trasfezione in maniera non stocastica. Per tale ragione si ricerca un disegno in grado di intrappolare una singola cellula su cui poter svolgere le analisi di interesse, potendo ottenere risultati deterministici di tipo on/off. L'obiettivo è il superamento delle attuali criticità presentate dalla terapia genica attraverso analisi di singola cellula, realizzabile tramite un dispositivo microfluidico economico e in grado di processare piccole quantità di materiale. L'idea è quindi quella di progettare, realizzare e validare un chip che permetta di isolare un numero elevato di singole cellule e garantirne la vitalità all'interno di camere di coltura in modo da poter eseguire in seguito studi di trasfezione genica.

In particolare i vantaggi che può offrire tale piattaforma sono riassumibili in: isolamento efficiente di singole cellule entro strutture che ne assicurino la vitalità e lo spazio di cui necessitano per proliferare; geometrie adeguate per indirizzare efficacemente il materiale genetico alle cellule bersaglio in modo sicuro e controllato; automazione del processo, in modo da ridurre i tempi di analisi; creazione di diverse condizioni indipendenti, su un medesimo dispositivo, in modo da studiare contemporaneamente diverse concentrazioni di vettori non virali.

Per il raggiungimento di tali obiettivi si rende necessario l'utilizzo di una piattaforma microfluidica per l'intrappolamento, la coltura e il condizionamento di singole cellule. Il progetto dovrà, quindi, prevedere il disegno di due unità funzionali distinte, che mirino a soddisfare le due specifiche principali: l'intrappolamento di singole cellule e la possibilità di un'analisi parallela di condizioni sperimentali diverse nello stesso dispositivo. La prima funzione potrà essere ottenuta tramite 6 unità di intrappolamento, indipendenti tra loro, che garantiscano l'isolamento di singole cellule sfruttando una resistenza idraulica variabile in modo automatico. La seconda sarà raggiunta implementando un generatore di gradiente di concentrazione lineare, in modo che permetta di miscelare non solo molecole, ma anche particelle di dimensioni elevate (fino a pochi μm di diametro), risultando quindi adatto alla generazione di un gradiente automatico di poliplessi.

Analisi agli elementi finiti, condotte tramite *software Comsol Multiphysics*, permetteranno di dimensionare l'intero circuito per ottimizzare le prestazioni delle due unità funzionali. Disegnato il dispositivo tramite *software CAD*, questo potrà essere prodotto in serie, tramite tecniche foto e soft litografiche. In seguito, dovranno essere condotti diversi test fluidodinamici preliminari, per verificare la tenuta, la funzionalità e l'efficienza dei dispositivi fabbricati, in termini di intrappolamento di singola cellula e formazione del gradiente lineare. Per verificare la biocompatibilità del dispositivo stesso, verranno in seguito condotte prove di validazione biologica.

La fase di progettazione, analisi computazionale, fabbricazione e validazione fluidodinamica dei dispositivi si svolgerà presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale (μBS Lab) del Politecnico di Milano (Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria). L'ottimizzazione del protocollo di semina e la successiva validazione biologica preliminare saranno effettuate presso il Laboratorio di

Biocompatibilità e Colture Cellulari (BioCell) del Politecnico di Milano (Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica “Giulio Natta”).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Progettazione del dispositivo microfluidico

Come già riportato, l'obiettivo del presente lavoro di tesi consiste nel progettare, realizzare e validare un dispositivo microfluidico che permetta l'intrappolamento e la successiva coltura di singole cellule per studi di trasfezione genica tramite vettori non virali.

A tal fine è stato disegnato un circuito basato su due unità funzionali principali: un'unità di intrappolamento e coltura cellulare e un generatore di gradiente di concentrazioni lineare. Quest'ultimo permette di ripartire una soluzione di interesse, a data concentrazione iniziale, in 6 diluzioni lineari (da 0% a 100% con *step* di 20%), indirizzabili in maniera indipendente ad altrettante unità di coltura poste a valle. In particolare, il generatore è stato progettato per miscelare particelle di dimensioni elevate (poliplessi con diametro variabile da 100 fino a 500nm), grazie alla presenza di particolari strutture che inducono *mixing* caotico (*herringbones*). Le 6 unità di intrappolamento, indipendenti tra loro, consentono di ottenere l'isolamento di singole cellule all'interno di camere di coltura, sfruttando una resistenza idraulica variabile in modo automatico e passivo.

Simulazioni computazionali hanno permesso di dimensionare le strutture caratterizzanti il dispositivo ed evidenziare quali fossero i parametri, in grado di fornire i risultati desiderati in termini di efficacia sia di intrappolamento che di *mixing*. Questo ha portato all'elaborazione di 7 varianti del medesimo dispositivo, caratterizzate da diverse combinazioni di larghezze di canali e trappole, mantenendo costante, invece, il *layout* del generatore di gradiente. I chip sono stati quindi fabbricati tramite tecniche di foto e soft litografia.

2.1.1. Unità di intrappolamento: specifiche di progetto e dimensionamento geometrico

Alla luce dell'obiettivo del presente lavoro di tesi, è stato progettato un dispositivo che in prima analisi fosse in grado di intrappolare efficacemente singole cellule all'interno di camere di coltura. Per raggiungere tale scopo, è stata inizialmente progettata una unità base per l'intrappolamento di singola cellula, il cui funzionamento si ispira al modello proposto da Hong et al. [15].

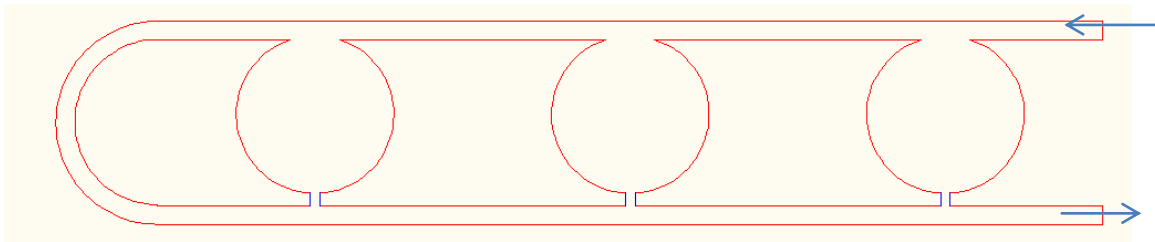


Figura 2.1- Unità base comprendente il canale principale che forma un'ansa, le 3 camere di coltura e alla loro base (in blu) le trappole. In evidenza il senso di scorrimento del flusso.

Tale unità base (Figura 2.1), sulla quale sono state eseguite simulazioni computazionali per ottimizzarne i parametri geometrici, risulta caratterizzata da 3 camere di coltura di forma circolare connesse, tramite due accessi diametralmente opposti, ad un canale principale. La connessione superiore è caratterizzata da un'apertura, verso il canale, sufficientemente larga da permettere l'ingresso delle cellule e il ricambio diffusivo del mezzo di coltura. La sua ampiezza è definita attraverso un parametro adimensionale dato dal rapporto tra diametro e apertura della camera. Dal lato di uscita, le camere sono in comunicazione con il canale principale mediante un breve condotto, a sezione trasversale semicircolare, avente dimensioni inferiori al resto del circuito. Tale condotto permette il passaggio di fluido dalla camera al canale principale a valle di essa, ma impedisce il passaggio delle cellule presenti nella camera e per tale motivo verrà definito trappola. Quest'ultima costituisce, infatti, una resistenza idraulica variabile in modo automatico e passivo: quando nessuna cellula è intrappolata (configurazione aperta) essa determina l'ingresso di una porzione di flusso all'interno della camera; una volta che una cellula arriva alla trappola (configurazione occlusa) la resistenza assume valori elevati, dovuti all'occlusione parziale o totale della trappola, impedendo o limitando la portata entrante dal canale principale alla camera. In figura 2.2 è indicato lo schema di funzionamento delle trappole. L'efficienza di tale

processo di intrappolamento dipende dai rapporti tra le resistenze idrauliche in gioco, definite a loro volta dalle dimensioni geometriche del canale principale e della trappola.

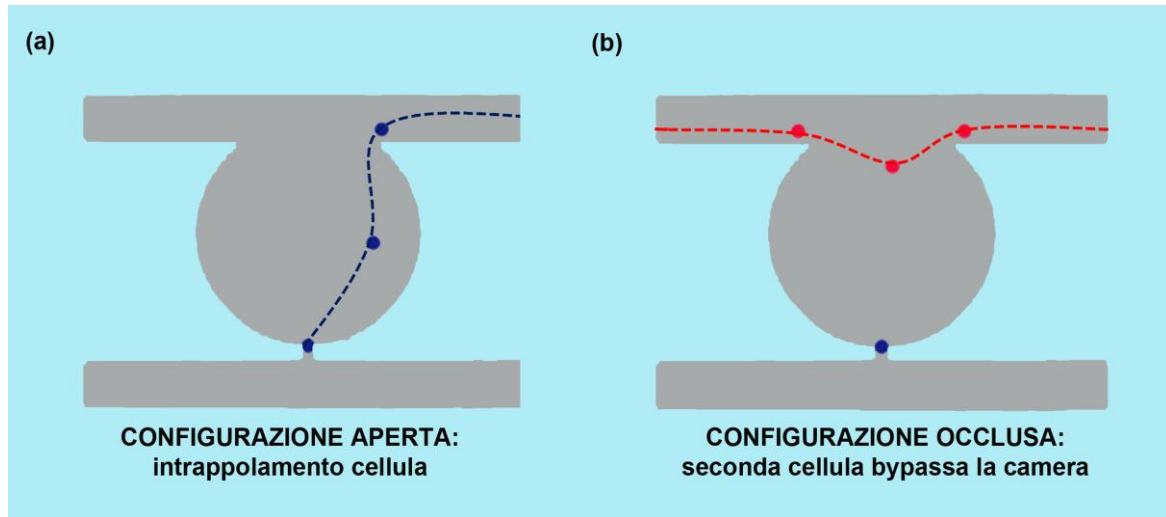


Figura 2.2- Successione temporale del meccanismo di intrappolamento: **a)** La cellula viene indirizzata verso la camera in configurazione aperta e quindi con la trappola libera e la occlude rimanendo intrappolata; **b)** La cellula successiva, trovando la medesima camera in configurazione occlusa, poiché la trappola è bloccata dalla cellula antecedente, prosegue oltre.

La scelta dei parametri geometrici è stata dettata, quindi, da specifiche di progetto ma anche da limiti di fabbricazione; in particolare si sono fissati i valori delle altezze dei canali e si sono mantenute variabili le larghezze. Questo perché, con le tecniche fotolitografiche, cui si ricorre per la realizzazione del dispositivo, il disegno viene scomposto in *layers*, fabbricati sequenzialmente su uno stesso wafer di silicio, ognuno dei quali contiene gli elementi del dispositivo caratterizzati dalla medesima altezza. Per difficoltà di realizzazione del wafer e costi di processo è consigliabile non includere più di tre *layer* in un progetto e questo limita le variazioni in altezza realizzabili. All'interno di uno stesso *layer* invece, gli altri parametri geometrici (larghezza e lunghezza dei canali) godono di maggiore libertà.

L'altezza della trappola è stata scelta pari a $5\mu\text{m}$, minimo valore fabbricabile possibile, in quanto deve essere impedito il passaggio delle cellule all'interno della stessa. L'altezza del *layer* dei canali principali e delle camere è stata stabilita pari a $25\mu\text{m}$, valore derivato da un compromesso tra le dimensioni del diametro medio delle cellule (Tabella 2.1) che devono scorrervi, la necessità di indirizzare linee di flusso all'interno delle camere, per permettere l'ingresso delle cellule stesse, e l'obbligo di mantenere la resistenza totale del dispositivo (dipendente da altezza e larghezza dei canali) all'interno di valori accettabili, inducendo

una caduta di pressione nei limiti dell'attuabilità. Oltre alle altezze delle diverse *features*, è stato fissato anche il diametro delle camere. Questi elementi, che devono presentarsi di dimensioni tali da ospitare una singola cellula garantendole elevato spazio per la proliferazione, non influenzano però l'efficienza di intrappolamento. Per tale ragione sono state escluse da analisi di ottimizzazione dimensionale ed il diametro è stato fissato pari a 250 μm . Questo valore, sovrastimato, assicura una regione di spazio sufficiente per la divisione cellulare. Si è scelto di fissare, anche, il valore dell'imbocco della camera, espresso tramite un parametro adimensionale dato dal rapporto tra diametro e ampiezza dell'imbocco stessa, imposto basandosi su dati di letteratura [15]. I valori fissati sono riportati in tabella 2.2.

	Hela	U87
valore [μm]	16.6	15.4
dev.st.	2.1	2.5
min	13.1	12.1
max	21.4	19.2

Tabella 2.1- Valore medio con deviazione standard e valori minimo e massimo dei diametri delle cellule utilizzate in fase di validazione.

Dimensione	Valore
Altezza canale e camera	25 [μm]
Altezza trappola	5 [μm]
Diametro camera	250 [μm]
Rapporto diametro/imbocco camera	3

Tabella 2.2- Parametri fissi dell'unità di base con rispettivi valori.

Le restanti caratteristiche del circuito (larghezza di canale e trappola) sono state, invece, mantenute variabili, al fine di valutarne, tramite analisi agli elementi finiti, l'influenza sul meccanismo di intrappolamento di singola cellula. Modificando tali grandezze e studiando le conseguenti variazioni di flusso ottenibili nelle tre camere, è possibile, infatti, ottimizzare il dispositivo per gli scopi desiderati. I *range* dei parametri mantenuti variabili sono riportati in tabella (Tabella 2.3).

Dimensione	Range	Passo
Larghezza canale	25-100 [μm]	25 [μm]
Larghezza trappola	5-15 [μm]	5 [μm]

Tabella 2.3- Parametri variabili dell'unità base e rispettivi range di valori.

Per limiti di fabbricazione, che impongono una larghezza minima delle *features* pari a $10\mu\text{m}$, la trappola larga $5\mu\text{m}$, è stata in seguito sostituita da una larga 8, più vicina ai limiti di fabbricazione.

Altro parametro sottoposto ad ottimizzazione risulta essere la portata, fondamentale per il conseguimento dell'intrappolamento cellulare. Basandosi sui lavori presenti in letteratura [15, 46, 52], in cui i dispositivi realizzano l'isolamento di singola cellula attraverso la variazione passiva delle resistenze, la portata di semina cellulare è stata variata tra 0,2 e $20\mu\text{L}/\text{min}$, mantenendo costante e fissa la densità cellulare pari, invece, a $0.2 \cdot 10^6$ cell/ml.

Individuazione di Q_{lim} e indici di efficienza

L'efficienza del processo di intrappolamento dipende, quindi, dalle dimensioni geometriche del canale principale e della trappola, che dovranno essere scelte in base a criteri di ottimizzazione univoci. Per questa ragione sono stati definiti degli indici di efficienza, che permettessero un confronto tra diverse configurazioni possibili. Per prima cosa, è stata calcolata, al variare della larghezza del canale principale, la portata minima in ingresso alla camera perché sia, teoricamente, garantito l'ingresso di almeno una cellula. Questa portata limite (Q_{lim}) è stata ottenuta simulando la partizione del flusso all'interno di semplici canali rettangolari. Dal momento che si suppone che le particelle, immesse in un canale micrometrico, seguano il filetto di fluido in cui è immerso il loro centro, senza alcun tipo di rimescolamento all'interno del fluido stesso. La Q_{lim} coincide con la porzione di portata corrispondente ad una sezione di canale di larghezza pari al raggio di una cellula (regione arancione Figura 2.3).

2.1.2. Unità di intrappolamento: Simulazioni fluidodinamiche computazionali

L'opportuno dimensionamento delle configurazioni analizzate per l'unità di intrappolamento e il calcolo degli indici di efficienza sono stati eseguiti sulla base di modellazioni, effettuate tramite *software Comsol Multiphysics*, che hanno permesso di effettuare analisi fluidodinamiche computazionali agli elementi finiti.



Figura 2.4- Modello 3D dell'unità base riprodotto in Comsol Multiphysics

Geometria analizzata

Per l'esecuzione delle simulazioni fluidodinamiche, si è disegnato un modello 3D della geometria precedentemente descritta (Figura 2.4), definito in modo parametrico, così da poter variare facilmente le dimensioni oggetto di confronto (Tabella 2.3).

Metodo numerico

In tutte le simulazioni fluidodinamiche si è considerato un flusso incomprimibile di tipo newtoniano, avente proprietà analoghe a quella dell'acqua a 37°C, sia in termini di densità che di viscosità, ricorrendo a un'approssimazione accettabile ai fini dell'analisi. A tale temperatura il mezzo di coltura si può ritenere, infatti, caratterizzato da una $\rho = 1000 \text{ kg/m}^3$ e una $\mu = 6.91 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Impostati i parametri costitutivi del materiale, si è passati alla

discretizzazione della sezione in esame in un numero finito di sottoregioni, secondo una griglia strutturata (*mesh*). Il problema, conformemente alla realtà dei sistemi microfluidici, è stato risolto sotto ipotesi di regime di moto stazionario e laminare. Sono state inoltre assegnate condizioni di non scorrimento alla parete e pressione nulla in uscita. Si sono considerate pareti rigide, essendo la deformabilità del materiale (polidimetilsilossano, PDMS) trascurabile nelle condizioni previste. Inoltre, per semplicità, si sono ipotizzate condizioni isoterme ed assenza di effetti gravitazionali, non influenti nella configurazione analizzata. Il calcolo dei campi di velocità e pressione è stato quindi realizzato applicando le equazioni di Navier-Stokes per un fluido incomprimibile, ancora impiegabili su scala microfluidica. Per valutare la convergenza, si è verificato che fosse rispettato il principio di conservazione della massa. A tale scopo, ci si è assicurati che la differenza netta dei flussi in ingresso e uscita si assestasse a valori inferiori allo 0.1% rispetto al flusso entrante.

Per quanto riguarda le cellule, queste sono state simulate mediante particolato, impiegando lo studio *Particle Tracing for Fluid Flow* di Comsol, che consente di modellizzare una seconda fase discreta in un sistema di riferimento lagrangiano, in aggiunta alla risoluzione delle equazioni di trasporto per la fase continua. Tale seconda fase è composta da particelle sferiche di diametro pari a $10\mu\text{m}$ e densità di 1060 kg/m^3 , di tipo inerte e prive di carica. Sono state assegnate condizioni di riflessione alla parete, non tenendo quindi conto della deformabilità della cellula, e dissolvimento in uscita. Si è ricorsi all'ipotesi di non interazione del particolato, avendo quest'ultimo una massa e una quantità di moto tali da non influire significativamente sulla fase continua. Si ipotizza, inoltre, una condizione di stazionarietà anche del particolato, oltre che del flusso, come sostenuto in precedenza. Si impostano il *range* temporale di rilascio, tra 0 e 4.5 secondi con un *time step* di 1.5 s, la posizione iniziale delle particelle secondo una griglia regolare sulla superficie di ingresso e, infine, il numero di particelle, pari a 10, che entrano, per ogni *time step*, alla medesima velocità del fluido.

Condizioni al contorno

Le analisi computazionali relative all'unità base sono state condotte considerando portate variabili tra 0.2 e $20\mu\text{L}/\text{min}$. Tale *range* permette di valutare l'efficienza di intrappolamento per i diversi valori di portata trovati in letteratura.

Distribuzione della portata in ingresso alle camere al variare della portata totale

Inizialmente è stata valutata la variazione della distribuzione della portata tra le camere al variare di quella totale nell'unità. Tale analisi è stata effettuata per tutte le combinazioni geometriche analizzate: larghezza della trappola (8, 10 e 15 μ m), larghezza del canale principale (25, 50, 75 e 100 μ m).

Ripartizione della portata al variare dei parametri geometrici di interesse

Si sono poi analizzati circuiti caratterizzati da una larghezza del canale principale variabile tra 25 e 100 μ m e larghezza della trappola pari a 8, 10 e 15 μ m. In prima analisi, la prima grandezza deve essere tale da creare una sezione di scorrimento non troppo ampia, in quanto dimensioni elevate produrrebbero una differenza resistiva tra canale e camera tale da generare un flusso esiguo verso la camera stessa. La seconda deve presentare un valore che permetta di variare in modo adeguato la resistenza fluidica, in rapporto al canale principale. Queste analisi hanno permesso di valutare la ripartizione della portata tra le camere al variare di tutte le *features* d'interesse.

Ripartizione della portata in camere occluse da cellule

Per simulare l'occlusione delle camere da parte di cellule intrappolate nel modello geometrico sono state inserite sfere solide di raggio 5 μ m all'imbocco del canale della trappola (Figura 2.5). Sono stati individuati quattro casi possibili, ognuno descritto da un modello geometrico peculiare:

- a- unità aperta (nessuna camera contenente cellule);
- b- prima camera occlusa;
- c- prime due camere occluse;
- d- tutte le camere occluse.

La distribuzione delle portate tra le varie camere è stata studiata al variare delle larghezze della trappola (8,10 e 15 μ m) e del canale principale (25,50,75 e 100 μ m) per ognuna delle 4 configurazioni riportate. Per il caso b- sono stati anche valutati gli effetti sulle portate conseguenti all'intrappolamento di cellule di diametro maggiore (16 μ m).

Perdite di carico lungo l'unità di base

I medesimi studi sono stati avviati al fine di valutare anche la caduta di pressione nelle diverse situazioni per comprendere se questa risultasse compatibile con i metodi di pompaggio e di aspirazione normalmente impiegati. La stima di questa grandezza ha inoltre permesso valutazioni in termini di dimensionamento complessivo del dispositivo; è stato, infatti, possibile, sulla base di questi dati, ricavare il numero di ripetizioni di unità di base realizzabili in serie, mantenendo la caduta di pressione all'interno dei limiti di attuabilità.

Protocollo sperimentale

Le prime semplici analisi numeriche, prendendo in considerazione solo il flusso di liquido, hanno consentito di limitare il campo di studio alle geometrie più efficaci. A queste sono seguite simulazioni in cui si sono modellizzate anche le cellule in sospensione, come un particolato con opportune proprietà. Questo ha permesso una valutazione generale più raffinata, oltre che la ricostruzione delle traiettorie seguite dalle particelle e la stima del numero di particelle in ingresso a ciascuna camera. Attraverso questi studi è stato quindi possibile selezionare, oltre al set di parametri dimensionali, la portata teorica di fluido che permette l'intrappolamento delle cellule in maniera più efficace ed efficiente. Ricavate le combinazioni dimensionali di canali e trappole più funzionali, ottenute grazie ai risultati delle prime simulazioni, si è potuta infatti vagliare, per ciascun caso, la portata che garantisce una adeguata percentuale di flusso in ingresso alle camere.

Le geometrie di interesse sono state successivamente studiate in configurazione occlusa, simulando l'avvenuto intrappolamento di una singola cellula nella camera; inizialmente si è considerata una cellula solo nella prima trappola, successivamente nelle prime due e infine in tutte le trappole. A tal fine, alla geometria descritta in precedenza è stata aggiunta una sfera di raggio pari a $5\mu\text{m}$ a livello della trappola posta alla base della camera (Figura 2.5), atta a modellizzare la cellula intrappolata. Una cellula verosimilmente è in grado di deformarsi potendo occludere completamente la trappola, ma la condizione che viene studiata è una semplificazione, che rappresenta la situazione sfavorevole, con presenza di trafiletti di liquido.

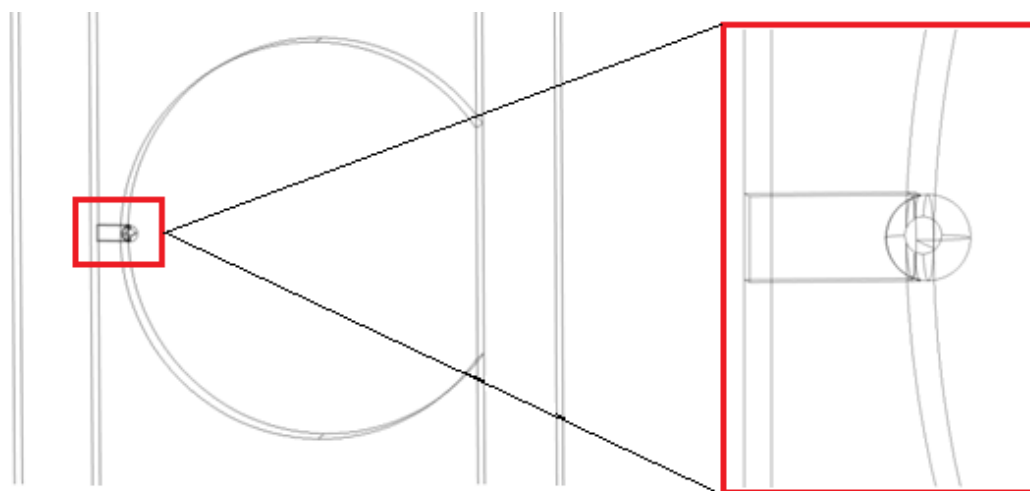


Figura 2.5- Riproduzione della sfera che modella la cellula a livello dell'ingresso della trappola

Sulla base dei risultati ottenuti in questa fase di progettazione, si è sviluppato un circuito microfluidico complesso, dato dalla replica di più unità elementari corrispondenti alla geometria sopra descritta, al fine di ottenere esiti significativi e di spessore statistico.

2.1.3 Generatore di gradiente: Specifiche di progetto e dimensionamento geometrico

Questo lavoro, volto alla cattura di una singola cellula su cui operare studi di trasfezione genica, mira a creare un gradiente di molecole, in particolare poliplessi, perché possa essere valutato per ogni vettore non virale, la condizione di trasfezione al variare della concentrazione somministrata. Per tale ragione, è stata progettata la seconda unità funzionale del dispositivo, consistente in un generatore di gradiente lineare, posto a monte delle camere, in grado di produrre diluizioni lineari di una data soluzione perfusa in ingresso, indirizzabili in maniera indipendente e controllata verso le unità di coltura a valle (Figura 2.6). Dal momento che la fisica dei fluidi alla microscala è caratterizzata da un flusso laminare con bassi numeri di Re , nei canali microfluidici il *mixing* di fluidi e piccoli soluti avviene essenzialmente per diffusione. A tale scopo è necessario fornire una lunghezza sufficiente al mescolamento (L_D), che dipende, inoltre, da altri fattori come velocità, densità, viscosità e coefficiente di diffusione dei fluidi in esame.

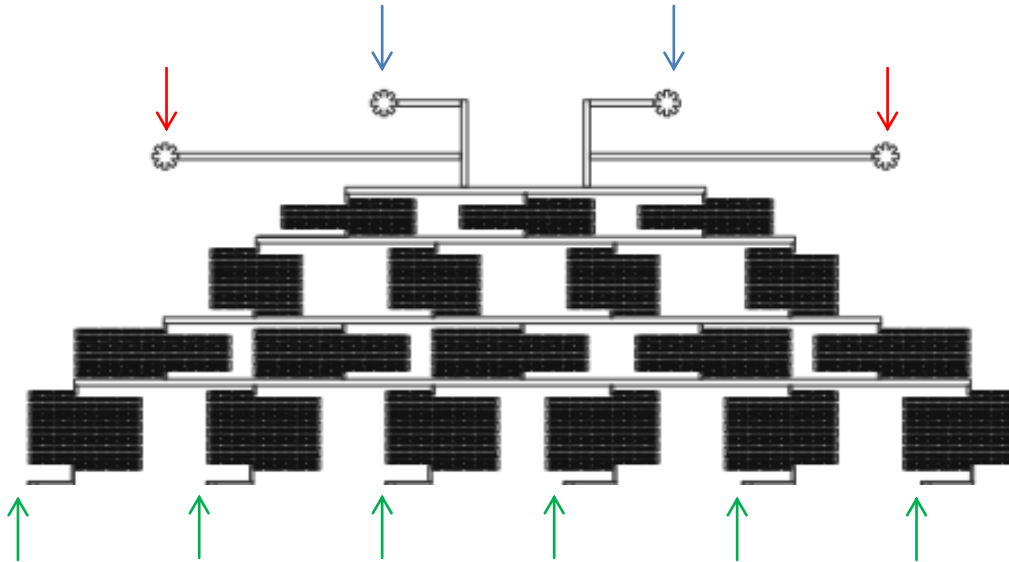


Figura 2.6- Generatore di gradiente lineare. In evidenza i due ingressi principali (freccie blu); i due ingressi secondari (freccie rossa); le sei uscite (freccie verde).

È stato quindi progettato un generatore di gradiente lineare a sei uscite e due ingressi, basato sul modello simmetrico introdotto per la prima volta da Jeon et al. [16]. Mentre i fluidi corrono lungo una rete di canali, che si dividono e riuniscono iterativamente, vengono più volte ricombinati, divisi e miscelati (nelle regioni verticali a serpentina), così che in ciascun ramo si ottengano concentrazioni diverse delle soluzioni infuse. Il numero totale dei rami determina il passo del *range* del gradiente e la risoluzione delle fasi che lo compongono. Nel caso in esame, è stato progettato un gradiente costituito da 5 livelli per ottenere una partizione della concentrazione iniziale in sei diluizioni lineari (0, 20, 40, 60, 80 e 100%). Modellizzando il circuito idraulico attraverso un equivalente elettrico è stata quindi valutata la partizione della portata all'interno dei diversi rami, imponendo le portate in uscita dalle sei linee del gradiente uguali tra di loro (Figura 2.7).

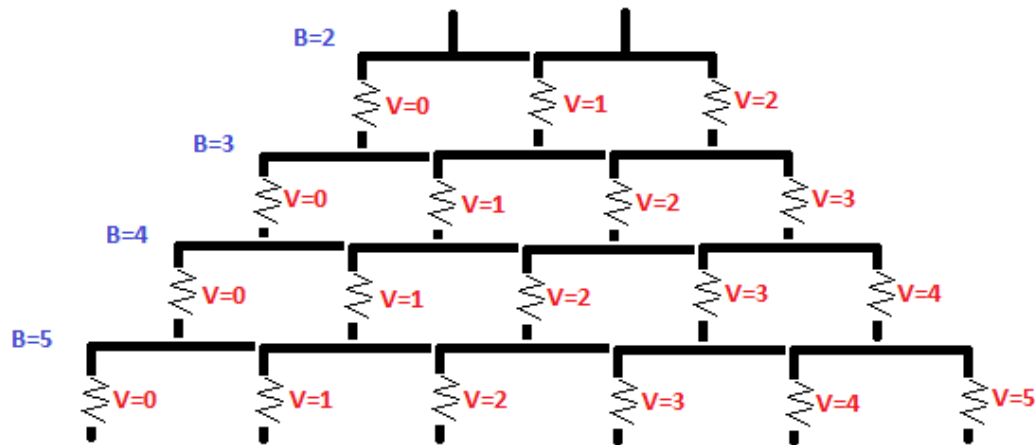


Figura 2.7- Equivalente elettrico del generatore di gradiente. In rosso l'etichetta e i valori attribuiti ai diversi rami. In blu l'etichetta e i valori dei livelli.

Per semplificare, si attribuiscono delle etichette ai diversi livelli, contenenti un numero via via maggiore di tratti di *mixing*, e ai tratti verticali di ciascun ramo. Ai primi viene attribuita la lettera B, che risulta uguale al numero di serpentine che convogliano in essi, ai secondi la V che, partendo da sinistra con valore pari a zero, assume valori crescenti man mano che aumentano i rami verso destra. Considerando trascurabile la resistenza dei tratti orizzontali rispetto a quella delle serpentine verticali, dal momento che queste ultime si presentano molto più lunghe (e aventi larghezza inferiore), e tenendo conto della simmetria del circuito microfluidico, è possibile calcolare il rapporto di divisione normalizzato in ogni punto della ramificazione della rete (nodo).

$$\text{La frazione di flusso a sinistra} = \frac{B-V}{B+1}$$

$$\text{La frazione di flusso a destra} = \frac{V+1}{B+1}$$

La partizione della portata all'interno dei diversi rami porta alla generazione dello schema in figura 2.8.

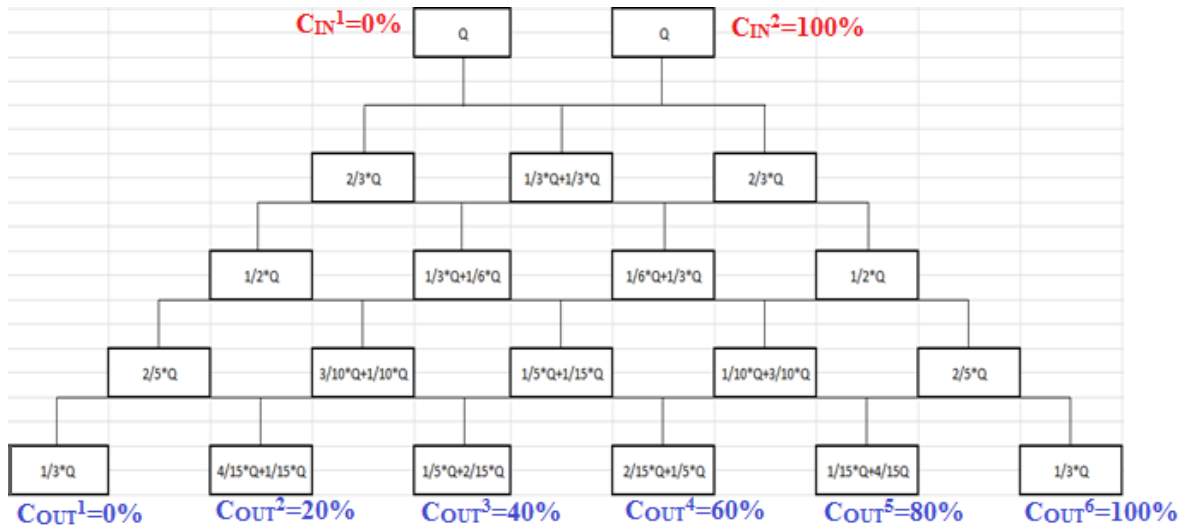


Figura 2.8- Schema rappresentativo dei livelli e dei rami costituenti il generatore di gradiente. Alla base di ogni ramo la porzione di portata che vi scorre all'interno, in funzione di quella data agli ingressi. In rosso le concentrazioni date ai due ingressi, in blu quelle ottenute in uscita.

Per quanto riguarda l'applicazione prevista per il suddetto lavoro, in ingresso sono date due portate identiche che si suddividono e si miscelano tra i diversi rami, sfociando in sei uscite caratterizzate da una portata pari a un $1/3$ di quella in ingresso. Nello specifico, in fase di coltura cellulare ai due ingressi viene imposta una portata di $30\mu\text{L/h}$, che permette di ottenere una perfusione di $10\mu\text{L/h}$ indirizzata verso ogni singola unità di intrappolamento, anche se solo l'1% di tale portata arriva alla serpentina, in quanto il resto viene indirizzato verso il canale di semina caratterizzato da una resistenza inferiore. La simmetria imposta fa sì che lungo ogni livello la portata risulti uguale in ogni ramo. Date in ingresso due diverse concentrazioni, alla fine del *network* che costituisce il generatore si avranno, a livello dei rami posti alle estremità, le medesime concentrazioni, nei rami interni, 4 diluizioni lineari delle due.

La progettazione specifica delle singole regioni a serpentina, nelle quali avviene il *mixing* vero e proprio, dipende, invece, dalle dimensioni delle sostanze da miscelare (ovvero dal coefficiente di diffusione D). Nell'ipotesi che si voglia ottenere un gradiente di concentrazione di sostanze di dimensioni trascurabili e caratterizzate da un elevato coefficiente di diffusione è importante che l'intervallo di tempo in cui i due flussi passano fianco a fianco nella serpentina sia sufficientemente lungo da permettere il totale mescolamento. La lunghezza dei canali di miscelazione deve essere quindi maggiore di quella minima (L_D) richiesta per raggiungere la piena omogeneità e risulta funzione del

coefficiente di diffusione della sostanza immessa, della geometria del canale e della portata.

Nel caso di canali a sezione rettangolare: $L_D = U \cdot t_D = U \cdot d^2 / D_D \approx Q / D_D$

Con U =velocità[m/s]
 t_D =tempo di diffusione[s]
 d =spazio di diffusione[m]
 D_D =coefficiente di diffusione[m²/s]
 Q =portata[m³/s]

Per l'acqua ($D_D=10^9$ m²/s; $\rho=10^3$ kg/m³; $\eta=10^{-3}$ Pa·s), ad esempio, i valori tipici di L_D sono nell'ordine della decina di mm, ma per molecole biologiche, di dimensioni consistenti, tali valori si innalzano di almeno un ordine di grandezza.

Scopo del presente dispositivo è quello di miscelare particelle di dimensione non trascurabile (diametro variabile tra 100 e 500 nm), i vettori non virali, e quindi non soggette alle equazioni diffusive del moto browniano. Tali molecole, come detto, danno origine a lunghezze di miscelazione difficilmente miniaturizzabili. Per tale ragione, la progettazione di un generatore di gradiente, basata sui principi di diffusione e moto browniano, non è risultata adatta alla specifica applicazione. Non potendo indurre turbolenza, è stato quindi progettato un rimescolamento caotico dei filetti fluidi. In letteratura sono riportati diversi tipi di *mixer*, i quali permettono di diminuire il tempo necessario per tale processo (e quindi L_D), ridistribuendo i fluidi e aumentando la probabilità per i soluti di trasporto e scambio tra gli stessi [53]. Tra questi, i miscelatori caotici sono ampiamente utilizzati grazie alla loro efficienza e semplicità di fabbricazione e funzionamento.

In particolare, per realizzare un mixing caotico di poliplessi all'interno del generatore di gradiente, si è ricorsi allo *staggered herringbone mixer* (SHM) [17, 54, 55] che consta di un canale rettangolare con scanalature a spina di pesce su una o più pareti dello stesso (Figura 2.7). Nel regime di flusso di Stokes, dove le forze viscoso dominano su quelle inerziali, questi elementi causano un flusso radiale, risultante in due vortici contro rotanti lungo la lunghezza del canale. Sono molto efficaci nel ridurre la lunghezza di mescolamento poiché accelerano il trasferimento di massa, aumentando l'area di interfaccia e diminuendo lo spessore su cui si verifica la diffusione. Dal momento che lo *stretching* e il *folding* dei volumi di fluido, che permettono ai fluidi stessi di rimescolarsi,

procedono esponenzialmente come funzione della distanza assiale percorsa, il *mixer* deve esser composto da diversi cicli in serie, che consentano il raggiungimento dell'omogeneizzazione delle specie da miscelare.

L'elemento base progettato è costituito da un ciclo di *mixing* caratterizzato da due set di scanalature, inclinate di un preciso angolo rispetto alla direzione assiale, legato all'*aspect ratio* (rapporto altezze larghezze dei canali) delle strutture stesse. Questi oggetti microstrutturati sono asimmetrici e sfalsati, nel primo emiciclo, a 1/3 della larghezza del canale. Il secondo set è costituito da spine di pesce speculari alle prime, sfalsate quindi verso il lato opposto della linea mediana. Questa alternanza riorienta il flusso in modo periodico, producendo una miscelazione caotica e offrendo prestazioni superiori anche a numeri di Re ridotti. Inoltre, grazie a questa configurazione si ottiene una bassa resistenza al flusso e una producibilità relativamente semplice con metodi litografici [17]. Sono riportati in tabella i valori delle dimensioni principali ricavate dalla letteratura (Tabella 2.4).

Dimensione	Valore	Espressione
Larghezza canale= w_c	60[um]	
Altezza canale	25[um]	
Lunghezza canale= L_c	416.56[um]	
Larghezza herringbone	15[um]	$1/4 * \text{larghezza canale}$
Altezza herringbone	9[um]	$2 * 0.18 * \text{altezza canale}$
Distanza tra herringbone	15[um]	$1/4 * \text{larghezza canale}$
Numero herringbone	6+6	
L_lato_herringbone_corto= L_{HBC}	20[um]	$1/3 * \text{larghezza canale}$
L_lato_herringbone_lungo= L_{HBL}	40[um]	$2/3 * \text{larghezza canale}$
Angolo γ -herringbone	45°	

Tabella 2.4- Dimensioni principali Staggered herringbone mixer

Sulla base della geometria riportata in letteratura [17], il *mixer* è stato modificato in modo che fossero anche rispettate le direttive per la fabbricazione tramite fotolitografia fornite dalla *Stanford University*, alla quale ci si è appoggiati per la realizzazione dello stampo su wafer di silicio (Figura 2.8). Mantenendone l'altezza, sono state aumentate la larghezza delle scanalature e la distanza tra le stesse, in modo che fosse mantenuto un *aspect ratio* di almeno 2:1. Sono riportati in tabella i valori delle dimensioni modificate rispetto al disegno base presente in letteratura. (Tabella 2.9).

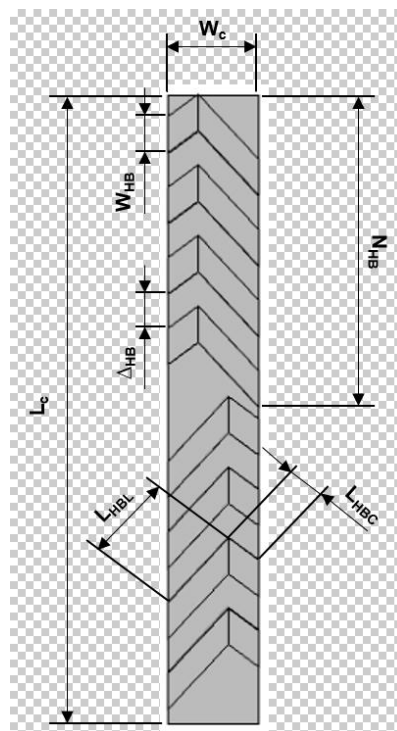
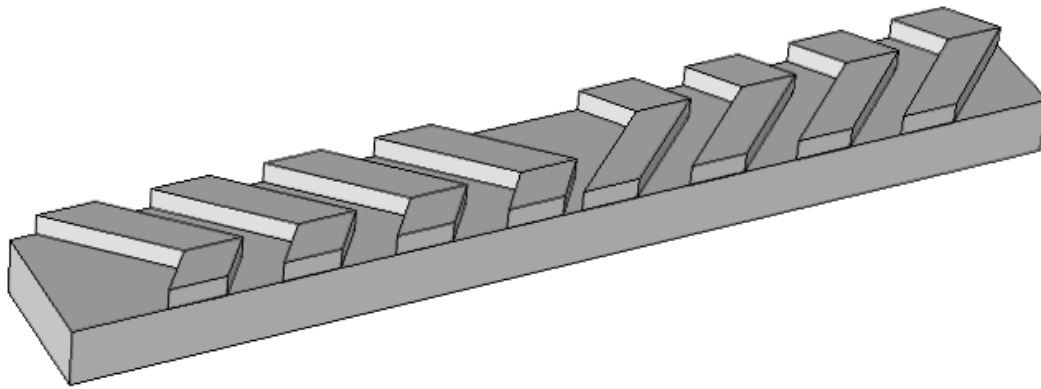


Figura 2.9- Staggered herringbone mixer modificato e relativi parametri dimensionali

Dimensione	Valore
Larghezza herringbone= w_{HB}	24[um]
Distanza tra herringbone= Δ_{HB}	23[um]
Numero herringbone= N_{HB}	4+4

Tabella 2.5-Dimensioni dello Staggered herringbone mixer variate in fase di progetto

2.1.4 Generatore di gradiente: simulazioni fluidodinamiche computazionali

L'effettiva efficienza degli *herringbones* è stata valutata tramite simulazioni computazionali che hanno permesso di ottenere una stima del livello di *mixing* raggiungibile.

Geometria analizzata

Per poter stabilire il numero di unità base di HB (*herringbones*) da porre in serie, per poter raggiungere il livello di mescolamento desiderato, si disegna il modello 3D di un *staggered herringbone mixer* cui si aggiunge in serie una successione di sue repliche in numero variabile. La geometria, così descritta, è inoltre dotata di due ingressi tramite cui è possibile simulare l'entrata delle due specie da miscelare.

Metodo numerico

Per studiare l'andamento del *mixing* e del campo di velocità delle due sostanze imposte agli ingressi, si è operato uno studio fluidodinamico, sulla base dei medesimi parametri costitutivi usati per le simulazioni precedenti. In condizioni di moto stazionario e flusso laminare, non scorrimento alla parete, pressione nulla in uscita e considerando pareti rigide, si è condotta una prima simulazione che ha permesso di ricavare i campi di velocità e pressione, applicando le equazioni di Navier-Stockes per fluido incomprimibile.

Allo studio fluidodinamico, è seguito uno studio di *Transport of Diluted Species* che, imposti ai due ingressi due fluidi con diverse concentrazioni di una specie non solubile, ha permesso di ottenere l'andamento della concentrazione lungo una successione di unità base, e, quindi, un'analisi quantitativa del *mixing* in funzione del numero delle unità stesse. Il risultato così ottenuto è stato, inoltre, confrontato con quello ricavato da simulazioni svolte a partire da una geometria affine, priva però delle scanalature a spina di pesce poste sulla parete superiore del canale. Ciò ha permesso di valutare l'effetto degli *herringbones*, oltre che di ricavare il valore di caduta di pressione all'ingresso di ogni unità di base aggiunta alla geometria.

Condizioni al contorno

Le analisi computazionali relative alla geometria degli HB sono state condotte considerando numeri di Re compresi tra 0.1 e 10, cui corrispondono portate pari a $Q=0.255-25.5\mu\text{l}/\text{min}$ imposte ai singoli ingressi. Tali scelte sono state operate al fine di valutare gli effetti dei diversi ordini di grandezza delle portate sul livello di *mixing* raggiungibile.

Campo di velocità

L'analisi e il confronto del campo di velocità ottenuto per il *mixer* con i risultati ottenuti dalle simulazioni svolte su canale rettangolare privo di scanalature, mostra l'effettiva natura del moto caotico che si genera in presenza degli HB. (Figura 2.10)

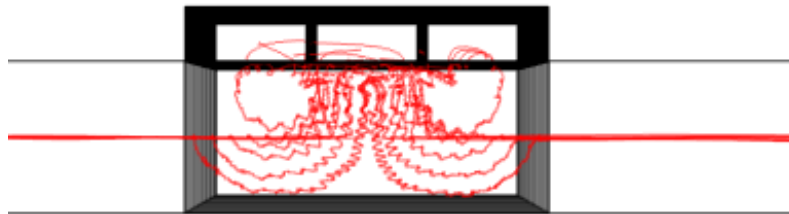


Figura 2.10- Immagine ottenuta da studi condotti tramite software Comsol. Sezione xz della geometria relativa ai canali con herringbones. Andamento delle streamlines rilasciate a livello della linea mediana del dispositivo considerato, a $Re=0,1$.

Nella geometria caratterizzata dalla presenza degli *herringbones*, si crea un flusso radiale, risultante in due vortici controrotanti lungo la lunghezza del canale. Le linee di flusso compiono un movimento rotazionale e caotico, che non è visibile nel modello privo di scanalature dove queste si mantengono lineari lungo il canale.

Caduta di pressione lungo le ripetizioni di HB

Gli studi computazionali avviati sulle due geometrie hanno permesso inoltre di ricavare un confronto relativo alla caduta di pressione che si genera lungo 10 successioni delle unità base di mescolamento. Nei grafici in figura 2.11, sono riportati gli andamenti della caduta di pressione lungo il generatore di gradiente in termini di unità di *mixing*, ricavati da

simulazioni condotte per numeri di Reynolds pari a 0,1 il primo grafico, 1 il secondo e 10 il terzo.

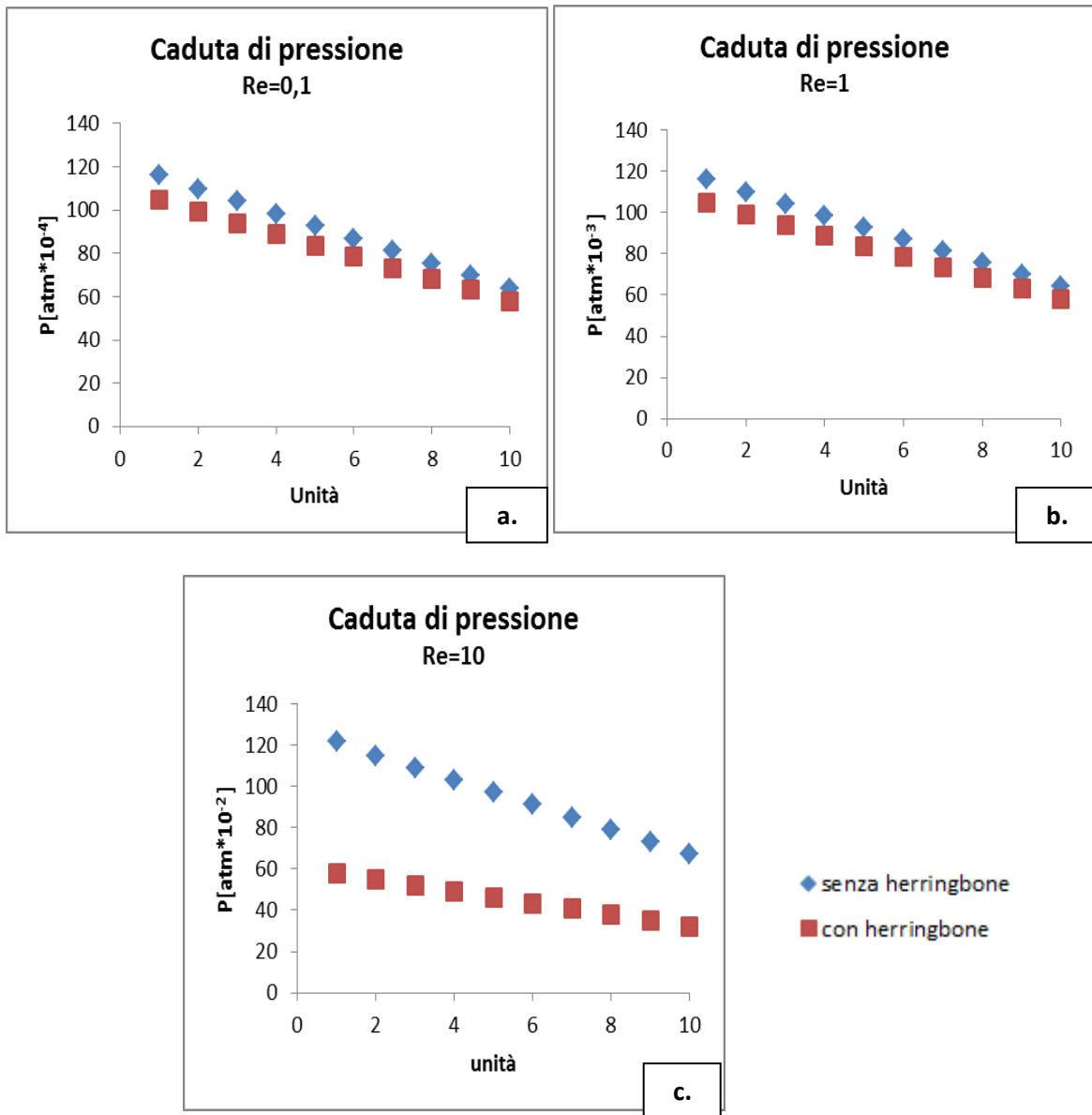


Figura 2.11- Andamento della caduta di pressione lungo le successioni di unità HB. Confronto tra geometria con herringbones e senza scanalature, a diversi numeri di Re: a) $Re=0,1$ b) $Re=1$ c) $Re=10$.

La pressione diminuisce con l'aumentare della successione di canali con un andamento lineare, sia in presenza di *herringbones*, sia in assenza di questi ultimi. In tutti e tre i casi, si presentano maggiori i valori di pressione relativi alla geometria priva di scanalature. Si evidenzia un valore di caduta di pressione doppio per geometrie senza HB, nel caso di numero di Re pari a 10.

Andamento della concentrazione

Le analisi computazionali di *Transport of Diluted Species*, hanno permesso di valutare l'andamento della concentrazione lungo la successione delle unità base di mescolamento. In figura 2.12, sono rappresentati, in scala colorimetrica, i valori di concentrazione lungo i canali delle due geometrie, costituite entrambe dalla ripetizione di 10 unità base, con o senza HB.

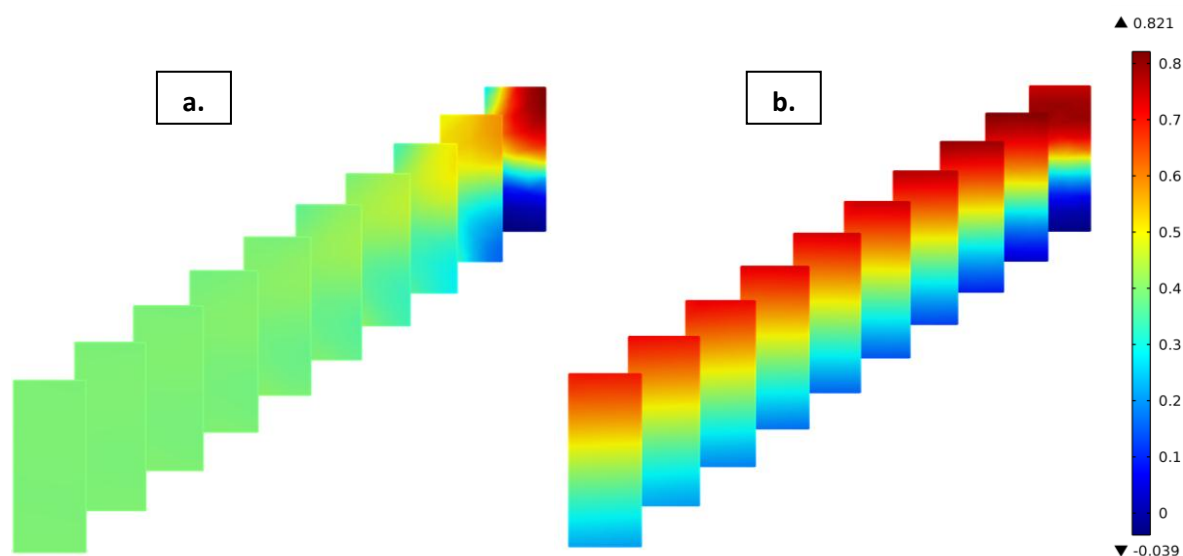


Figura 2.12- Immagini ottenute da studi condotti tramite software Comsol. Andamento della concentrazione delle due soluzioni immesse in ingresso con $Re=0.1$ (portata pari a $0,255\mu\text{L}/\text{min}$), lungo le successioni di unità. **a)** geometria caratterizzata dalla presenza di herringbone **b)** geometria priva di scanalature. In primo piano visibile la concentrazione a livello dell'unità 10, in ultimo quella relativa alla prima unità. A destra scala colorimetrica (in blu concentrazione nulla; in rosso concentrazione massima pari a 1)

L'immagine a destra (Figura 2.12b), relativa alla geometria priva di scanalature, mostra come, dopo 10 successioni dell'unità base, le due specie siano ancora ben separati e distinguibili. In quella a sinistra (Figura 2.12a), invece, le due specie risultano mescolati e non più definibili. L'andamento delle concentrazioni può essere analizzato anche attraverso un grafico, ricavato da dati ottenuti con simulazioni computazionali, che ne studi le variazioni lungo le sezioni delle unità base (Figura 2.13). Posto sull'asse x la larghezza del canale e sulle y la concentrazione, si valuta l'andamento della concentrazione all'interno del canale, all'inizio di ogni unità base. La curva relativa alla prima unità (in blu) è caratterizzata, in entrambi i casi, da concentrazione nulla in corrispondenza di spessore pari a zero (ingresso 1) e massima per spessore massimo ($60\mu\text{m}$, ingresso 2).

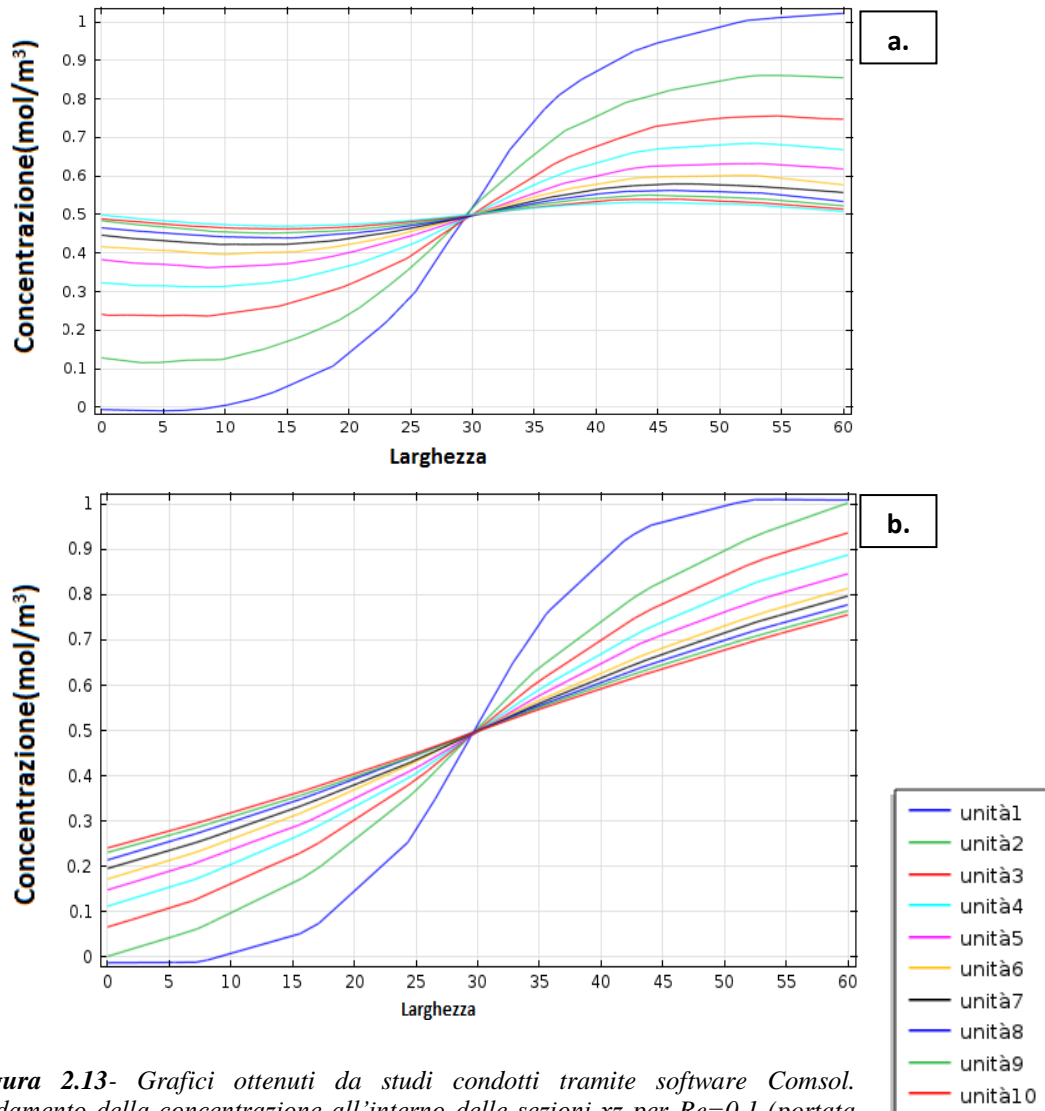


Figura 2.13- Grafici ottenuti da studi condotti tramite software Comsol. Andamento della concentrazione all'interno delle sezioni xz per $Re=0.1$ (portata $0,255\mu\text{L}/\text{min}$). **a)** Geometria con herringbones **b)** senza herringbones. Ad ogni colore corrisponde una curva, relativa alla variazione di concentrazione entro una sezione, considerata a livello dell'ingresso di ogni unità.

All'avanzare dei due fluidi lungo le unità sequenziali HB si nota come le curve si appiattiscano sempre di più per la geometria caratterizzata dalla presenza di scanalature, raggiungendo alla fine una concentrazione uniforme lungo tutta la larghezza del canale (Figura 2.13a). Nel grafico ottenuto per canale senza herringbones, al contrario, anche dopo 10 unità le curve risultano ancora sfasate e caratterizzate da concentrazioni diverse lungo lo spessore del canale stesso, indice di separazione tra i due fluidi (Figura 2.13b).

La combinazione dei risultati relativi al numero minimo di unità HB per ottenere mixing completo e alla caduta di pressione in funzione del numero di unità sequenziali, ha infine

permesso di stabilire il numero di unità di mescolamento per ogni ramo del generatore di gradiente, come riportato in tabella 2.6.

	Numero di HB
Livello1	30
Livello2	40
Livello3	50
Livello4	60

Tabella 2.6- Numero di unità HB costituenti ogni ramo relativo ad un certo livello.

Dal momento che il *mixing* migliora all'aumentare delle portate, serviranno meno unità di HB nei rami in cui la portata risulta maggiore, in quanto serviranno meno cicli per ottenere il livello di mescolamento desiderato. Percorrendo i vari livelli, la portata si ripartisce e scorre in quantità sempre minore nei rami, richiedendo quindi un numero crescente di unità di *mixing*. Si è scelto di caratterizzare il primo livello con rami di *mixing* dati dalla successione di 30 HB, per poter mantenere un margine di sicurezza, nonostante il mescolamento sia soddisfacente e uniforme anche per numeri di unità HB inferiori. Questo consente l'utilizzo di tale elemento a portate anche inferiori, rispetto a quelle previste in tale lavoro.

Basandosi sull'equivalente elettrico del circuito fluidico, è stato infine possibile trovare la pressione totale offerta dal generatore di gradiente così progettato, ricavandola dalla legge di Hagen-Poiseuille:

$$\Delta P = Q * R_H$$

Con Q=portata[m³/s]
 ΔP =caduta di pressione[Pa]
 R_H =resistenza idraulica[Pa·s/m³]

sapendo che per canali microfluidici rettangolari la resistenza idraulica, oltre che ricavata tramite le simulazioni computazionali, può esser valutata tramite la relazione [20]:

$$R = \frac{12\eta L}{wh^3 \left(1 - \frac{h}{w} \left(\frac{192}{\pi^5} \sum_{n=1,3,5}^{\infty} \frac{1}{n^5} \tanh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)\right)\right)}$$

Con η =densità fluido[kg/m^3]
 L =lunghezza canale[m]
 w =larghezza canale[m]
 h =altezza canale[m]

Ottenendo una resistenza equivalente, data dalla somma delle resistenze relative a ciascun livello, ognuna divisa per il numero di rami presenti nel livello stesso, pari a $R_{eq}=3,3 \cdot 10^{14}$ $\text{Pa} \cdot \text{s}/\text{m}^3$, a fronte di una portata totale data ai due ingressi del generatore pari a $Q_{in}^{TOT}=60 \mu\text{L}/\text{h}$ (valore selezionato per la perfusione delle cellule in fase di coltura), corrisponde una caduta di pressione di solo 0,05 atm.

2.2. Realizzazione del dispositivo microfluidico

Conclusa la fase di progettazione e dimensionamento del dispositivo, si è passati alla realizzazione dello stesso. Punto di partenza è lo sviluppo di un disegno bidimensionale del chip basato sulle specifiche di progetto, prodotto avvalendosi di un software CAD (AutoCAD® prodotto da Autodesk®). Il *layout* finale (Figura 2.15) risulta costituito da un generatore di gradiente lineare a 6 uscite, che sfociano in altrettante unità di intrappolamento, costituite ognuna da 16 unità base per un totale di 48 camere di coltura. Per definire il sistema di intrappolamento ottimale, si sono selezionati 3 diversi valori relativi alle larghezze dei canali principali (50,75,100 μm) e 2 della trappola (10 e 15 μm). Avendo ancora spazio a sufficienza per un ulteriore disegno del circuito, si è scelto di riportarne uno con trappola larga 8 μm (canale largo 50 μm), compromesso tra la trappola da 5 μm selezionata inizialmente e i limiti di fabbricazione imposti (larghezza minimo 10 μm). Si sono ottenute quindi 7 diverse combinazioni del disegno base. Ognuna delle unità di intrappolamento e coltura è stata dotata un canale di semina, per il passaggio delle cellule, e uno di uscita, per la raccolta del *waste*.

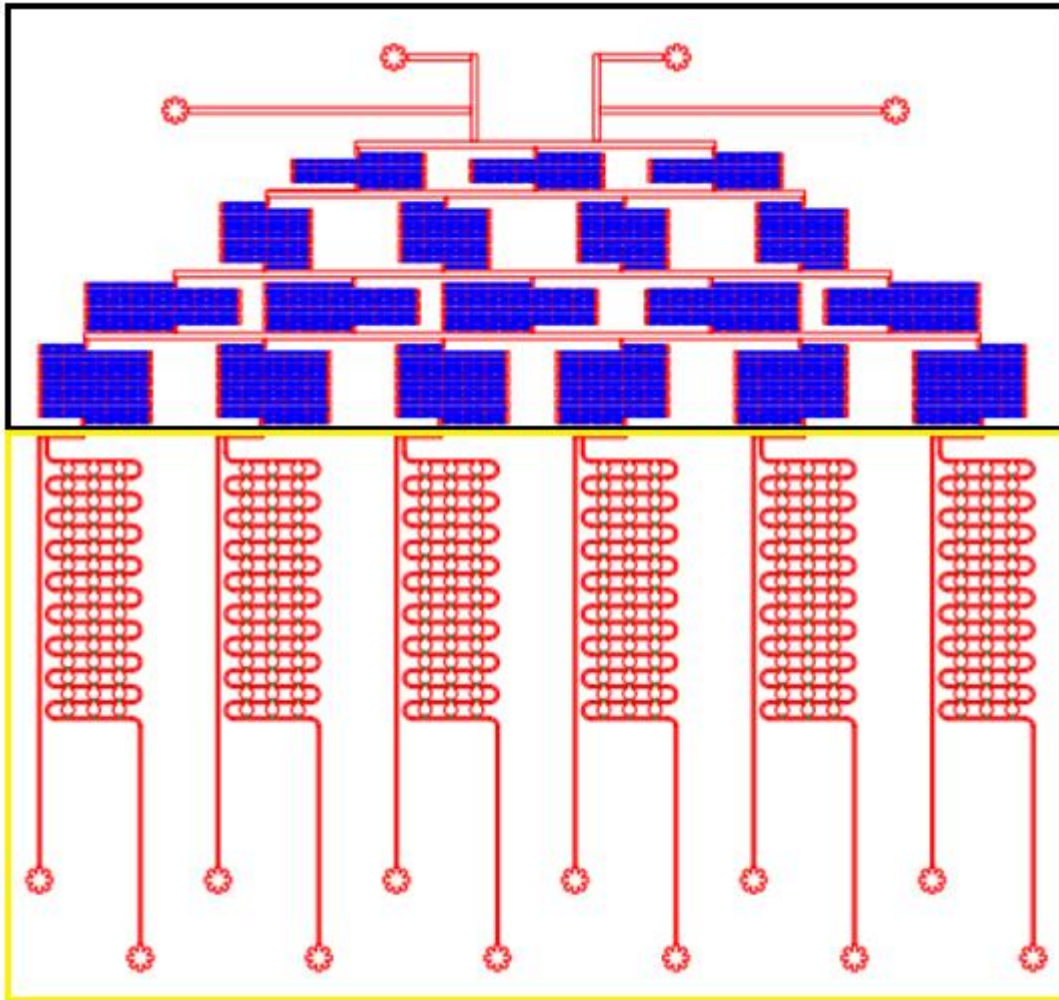


Figura 2.15- Layout finale del dispositivo: generatore di gradiente (riquadro nero) e unità di intrappolamento (riquadro giallo).

Il disegno finale risulta costituito da 3 *layer*, ognuno caratterizzato da *features* con medesima altezza. Il primo contiene le trappole (in verde), con altezza pari a $5\mu\text{m}$; il secondo è quello relativo ai canali di semina e scarto, alla serpentina e alle camere delle unità di intrappolamento, nonché ai canali costituenti il generatore di gradiente (in rosso), tutti caratterizzati da un'altezza pari a $25\mu\text{m}$; l'ultimo *layer* è composto dalle microstrutture degli *herringbones* (in blu), che si poggiano sui canali quadrati dei tratti verticali, che compongono il generatore di gradiente, con un'altezza pari a $9\mu\text{m}$. Le dimensioni finali utilizzate per la realizzazione del dispositivo, oltre che rispondere a esigenze cellulari e necessità applicative evidenziate nella fase di progettazione, sono state selezionate in base a linee guida standard per la produzione litografica, proposte dalla *Stanford Microfluidics Foundry*, laboratorio della *Stanford University* presso cui sono stati fabbricati i wafer di silicio dei chip. Tra questi, gli accorgimenti di maggiore rilevanza sono: rapporti altezza-larghezza dei canali non superiori a 1:10, in modo da impedire alla

struttura di collassare; dimensione minima in altezza $5\mu\text{m}$, in larghezza $10\mu\text{m}$. Una volta completato il disegno è necessario scalare l'intera geometria comprendente il *layer* fluidico, relativo a canali, camere e gradiente, e quello relativo alle trappole dell'1.7%, per compensare il ritiro che il polimero subisce nel momento dell'estrazione dallo stampo in silicio dopo la reticolazione.

Il file di progetto così ottenuto è stato inviato al laboratorio della *Stanford University*, che produce, tramite tecniche fotolitografiche, il corrispondente *master* microstrutturato in silicio. Il trasferimento del *pattern* è realizzato mediante l'esposizione alla radiazione UV di un film fotosensibile (fotoresist), depositato tramite *spin-coating* su un wafer liscio. Il fascio collimato di luce viene filtrato attraverso la fotomaschera, prestampata su pellicola di acetato a partire dal disegno CAD, inducendo la reticolazione selettiva della porzione esposta (fotoresist positivo) o non esposta (fotoresist negativo) alla luce. Se il fotoresist è positivo, mostra infatti la proprietà di diventare solubile per attacco chimico, viceversa, se è negativo, essendo di per sé solubile, diventa insolubile per irradiazione. L'utilizzo del primo consente di ottenere canali con profili arrotondati, il secondo fornisce canali squadrati. Per questo lavoro solo il *layer* relativo alle trappole è stato ottenuto tramite fotoresist positivo. Il processo descritto (Figura 2.16), avviene in una particolare camera chiamata *clean room*, in cui temperatura e umidità sono accuratamente regolate e numero e dimensioni delle particelle presenti nell'atmosfera sono limitati e tenuti sotto controllo.

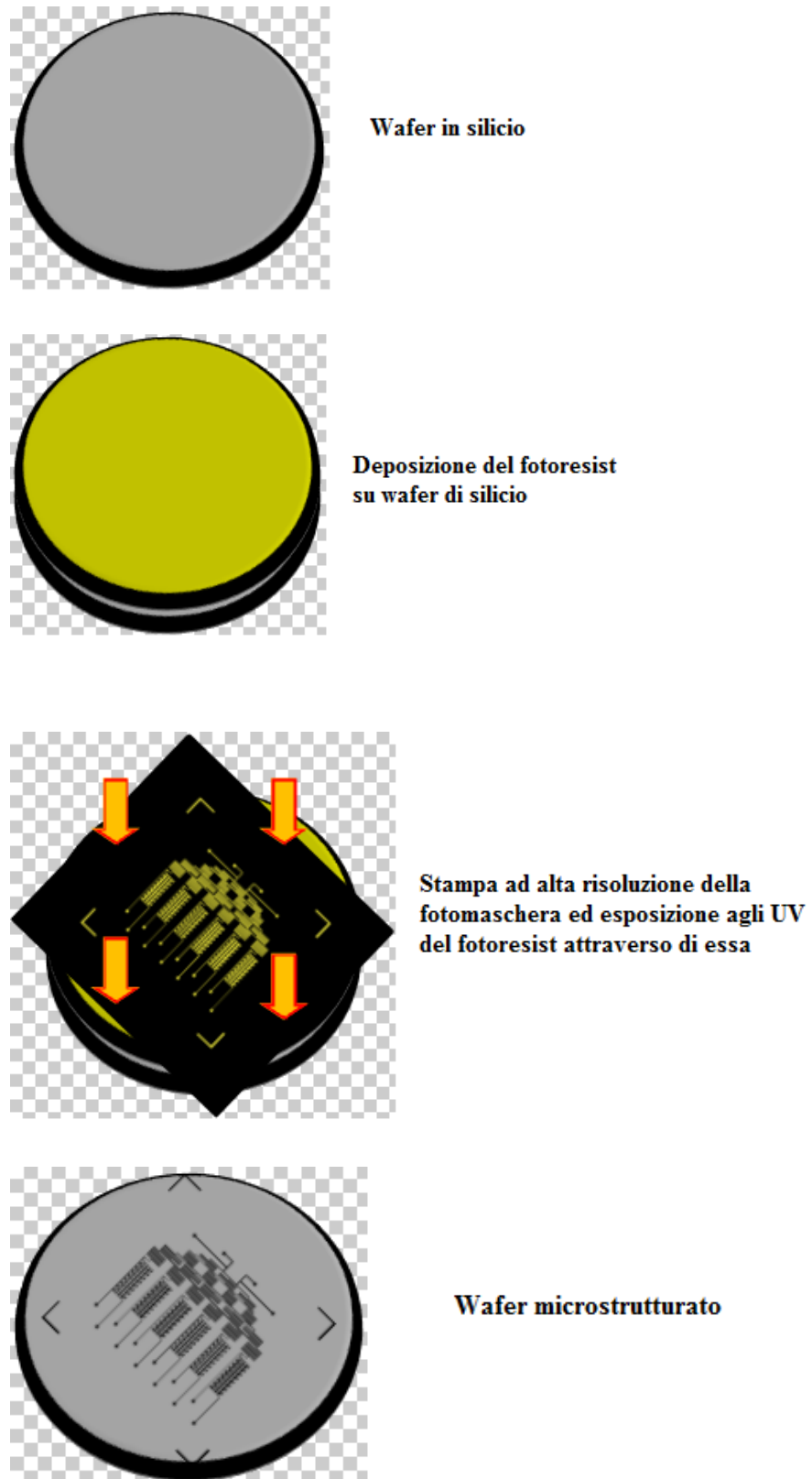


Figura 2.16- Schema del processo fotolitografico

Prodotto il *master*, è possibile ottenerne, tramite *replica molding*, una copia negativa. Quest'ultima viene realizzata in PDMS, in quanto in termini di costi, tempi di preparazione e lavorabilità, esso si colloca tra i polimeri più utilizzati nel campo della microfluidica. I legami chimici che lo caratterizzano conferiscono al PDMS alcune proprietà distintive, tra cui una buona stabilità termica, bassa tensione superficiale e trasparenza ottica, venendo apprezzato dal punto di vista biomedico per la propria inerzia, stabilità biocompatibilità e bassa autofluorescenza. Per quanto riguarda, invece, le applicazioni nella microfluidica, si contraddistingue soprattutto per la sua permeabilità ai gas, il comportamento elastomerico e le proprietà di superficie. La caratteristica elastica del PDMS assicura un ottimo contatto conformazionale ed il basso valore di energia libera superficiale garantisce una bassa adesione con qualsiasi materiale con cui venga a contatto, il che implica una facile rimozione dello stampo silconico senza danneggiare il *master*[56, 57].

Nonostante gli innumerevoli vantaggi, tale materiale risulta però soggetto a un fattore di restringimento dell'1.5%-1.7% in seguito al processo termico di reticolazione, motivo per cui in fase di progetto, le dimensioni del disegno vengono aumentate di un fattore pari all'1,7% . Inoltre il basso modulo di elasticità del PDMS, limita l'*aspect-ratio* (rapporto tra altezza e larghezza delle strutture) delle microstrutture e per tale ragione, sempre al momento della progettazione, si è fatto riferimento ai limiti imposti dalla *Standford*, in modo che fossero evitate deformazioni e distorsioni della struttura.

Lo stampo in PDMS è ottenuto miscelando, in determinato rapporto in peso, i due elementi forniti nel *Sylgard 184 (Dow Corning)*, costituito da una base in una gomma silconica liquida (PDMS avente gruppi vinilici alla terminazione della catena) ed un agente reticolante. I gruppi idruro di silicio presenti nell'agente reticolante reagiscono con i gruppi vinilici presenti nell'elastomero silconico di partenza, formando così il polimero in fase liquida. Risulta di primaria importanza ricavare il giusto rapporto di componenti costituenti il PDMS, per sfruttare al massimo le proprietà offerte dall'elastomero stesso. Il compromesso adeguato fra flessibilità e resistenza per l'applicazione prevista è raggiunto da un rapporto tra prepolimero e agente indurente di 10:1 in peso. Raggiunta l'omogeneità della miscela e avvenuta la reazione di reticolazione, questa viene sottoposta a un ciclo di vuoto perché siano eliminate tutte le bolle, formatesi come conseguenza della presenza di aria, inglobata durante la preparazione della stessa. Una volta debollata, la soluzione di prepolimero viene colata sul wafer di silicio, precedentemente sottoposto a processo di silanizzazione, al fine di favorire il distacco dello stampo (Figura 2.17). Il complesso

PDMS-wafer, nuovamente posto in camera di degasaggio, chiusa ermeticamente e collegata ad una pompa a vuoto per eliminare eventuali altre bolle, viene lasciato polimerizzare in stufa a 65°C per due ore.

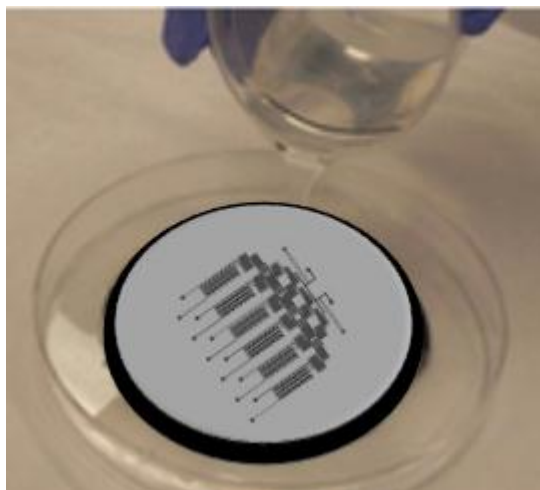


Figura 2.17- Colata di PDMS su wafer di silicio

Trascorso tale periodo e avvenuta la polimerizzazione, i dispositivi vengono delicatamente separati dai wafer e, privati dei profili in esubero, vengono riposti su piastra riscaldata a 150°C per circa 10 minuti, per finalizzare la reticolazione. Raffreddati i chip, vengono apportati i fori di ingresso relativi al gradiente e ai canali di semina, nonché quelli di uscita dalle unità di intrappolamento in corrispondenza degli opportuni marker del circuito, tramite l'utilizzo di una fustella con diametro di 500µm (Figura 2.18).

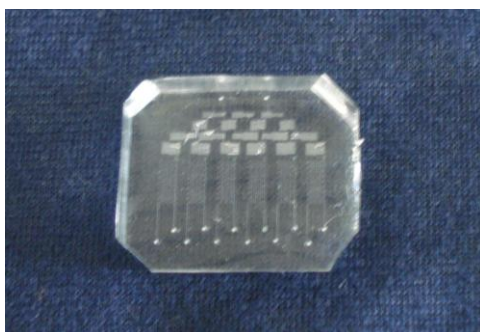


Figura 2.18- Chip in PDMS con fori apportati

La fabbricazione del chip si conclude quindi unendo lo stampo in PDMS, che contiene i canali microfluidici progettati e chiusi su tre lati, a un vetrino o ad un altro strato di PDMS non microstrutturato, per sigillare le due interfacce e creare canali entro cui far scorrere i campioni e i fluidi di interesse. Per garantire la funzionalità del *bonding* e, quindi, accurati risultati legati a successivi esperimenti, è necessario preservare il chip da agenti esterni e

inquinanti. Particolare attenzione va riposta nella pulizia della superficie su cui è inciso il circuito e in quella del vetrino su cui in seguito verrà fatto aderire. La migliore soluzione a tale scopo risulta essere per il chip l'uso di nastro adesivo, per il vetrino un ciclo di lavaggio in tre soluzioni: acetone, isopropanolo ed etanolo. Successivamente chip e vetrino vengono posti in un plasma cleaner (*Harrick Plasma*), dove vengono prima sottoposti a 1 minuto di vuoto e poi all'azione del plasma per 2 minuti e 30 secondi, che attivando le due superfici ne permette il *bonding*. Una volta estratti i componenti, le superfici di interesse degli stessi devono essere poste in contatto tra loro applicando una leggera pressione, in modo da eliminare l'aria interposta. A questo punto il chip viene sottoposto a trattamento termico in stufa a 65°C per 1h per assicurare l'adesione, stabilizzando e rafforzando il legame tra le due superfici. (Figura 2.19)

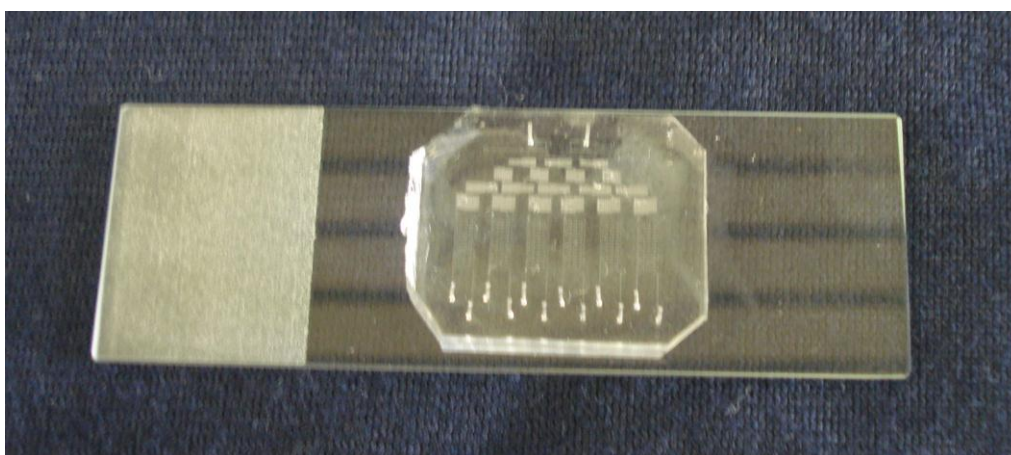


Figura 2.19- Dispositivo in PDMS adesivo al vetrino

Attraverso i fori apportati, vengono inseriti dei connettori metallici, a cui erano stati precedentemente calzati tubi in tygon di diametro interno pari a 500 μm . Queste connessioni consentono di immettere fluidi all'interno del dispositivo. La scelta di questi particolari tubi è dovuta all'inerzia che essi offrono alla maggior parte dei reagenti di laboratorio, risultando atossici e dotati di una buona stabilità anche a seguito di uso prolungato (Figura 2.20).

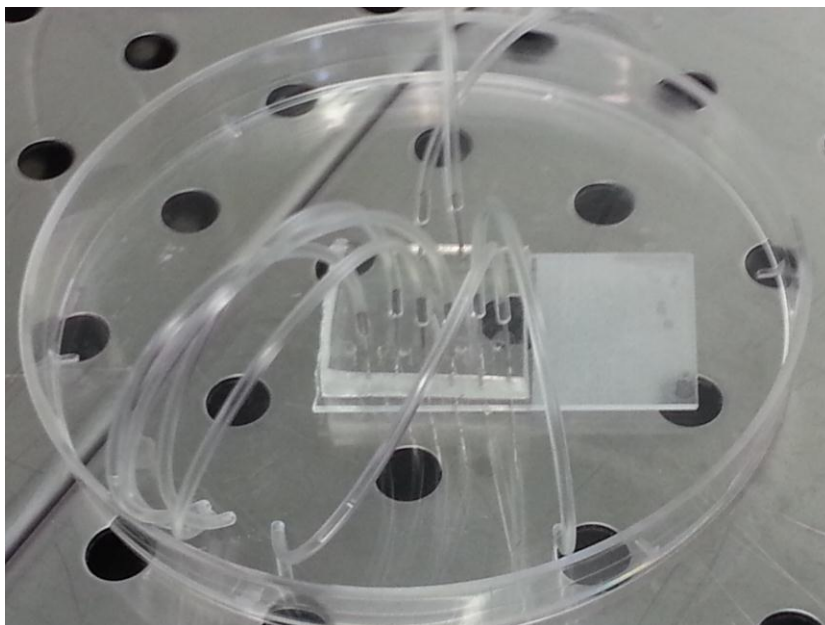


Figura 2.20- Dispositivo ultimato e completo di tubi in tygon

2.2.1 Caratterizzazione dimensionale del dispositivo

In seguito al processo di realizzazione, è stata eseguita un'analisi dimensionale dei dispositivi per valutare la precisione di realizzazione degli stampi. Per poter analizzare la fedeltà dei dispositivi realizzati rispetto al disegno di progetto, sono state acquisite ed elaborate diverse immagini di microscopia, tramite cui è stato possibile misurare i principali parametri geometrici di interesse. Tramite microscopio ottico Nikon SMZ 1000, dotato di una telecamera *Unibrain Fire-i™*, sono stati acquisiti i particolari di interesse a diversi ingrandimenti. Le immagini così ottenute sono state acquisite al computer, tramite software *Fire-i™*, e analizzate tramite software *Image J* (versione 10.2).

Le dimensioni prese in considerazione sono state le dimensioni giacenti sul piano del wafer nonché l'altezza delle diverse *features*. Sono state acquisite 5 immagini, derivanti da altrettanti dispositivi, e ricavate 3 diverse misure. Queste ultime sono state poi confrontate con i valori dimensionali previsti da progetto, per constatarne la fedeltà di riproduzione. La presenza di differenze statisticamente significative tra le condizioni confrontate è stata analizzata attraverso il test statistico t test utilizzando il software *GraphPad Prism v5.00* (GraphPad Software, USA).

2.3. Validazione sperimentale del dispositivo microfluidico

In seguito alla produzione e caratterizzazione dimensionale dei dispositivi progettati, sono stati condotti diversi test preliminari, che hanno permesso di verificare la tenuta, la funzionalità e l'efficienza dei dispositivi fabbricati. Sono state esaminate diverse variabili in differenti condizioni, per poter ottenere una più ampia e completa analisi della soluzione proposta. A questo scopo, sono stati utilizzati durante gli esperimenti una pompa a siringa, che ha permesso la regolazione delle velocità del fluido all'interno dei canali attraverso l'imposizione di una portata in ingresso, e uno sfigmomanometro, grazie al quale è risultato possibile un controllo in pressione. Nello specifico, per quanto riguarda le unità di intrappolamento, sono valutate l'effettiva l'indipendenza delle stesse e la loro efficienza di intrappolamento. A queste analisi sono, inoltre, seguite prove cellulari preliminari per una validazione di tipo biologico. Per quanto concerne, invece, il generatore di gradiente, si sono eseguite misure per una validazione di tipo fluidodinamico e prove sperimentali per la valutazione del *mixing* sia di piccole specie (coloranti) sia di particelle.

2.3.1. Unità di intrappolamento: validazione fluidodinamica

Il primo aspetto che si è voluto prendere in considerazione è legato all'indipendenza delle 6 unità di intrappolamento, costituenti il dispositivo. La capacità di garantire l'autonomia di questi elementi consente di eseguire semina, coltura e analisi su ogni unità di intrappolamento, come fossero le uniche presenti sul dispositivo, non risultando influenzate dalla presenza o dalle condizioni cui sono sottoposte le altre. Di notevole vantaggio risulta, infatti, la possibilità di testare simultaneamente diverse condizioni, ricorrendo ad un unico chip. A tal fine, in fase di progetto, le unità di intrappolamento sono state disegnate tra loro in parallelo e provviste ognuna di propri ingressi e uscite. (Figura 2.21)

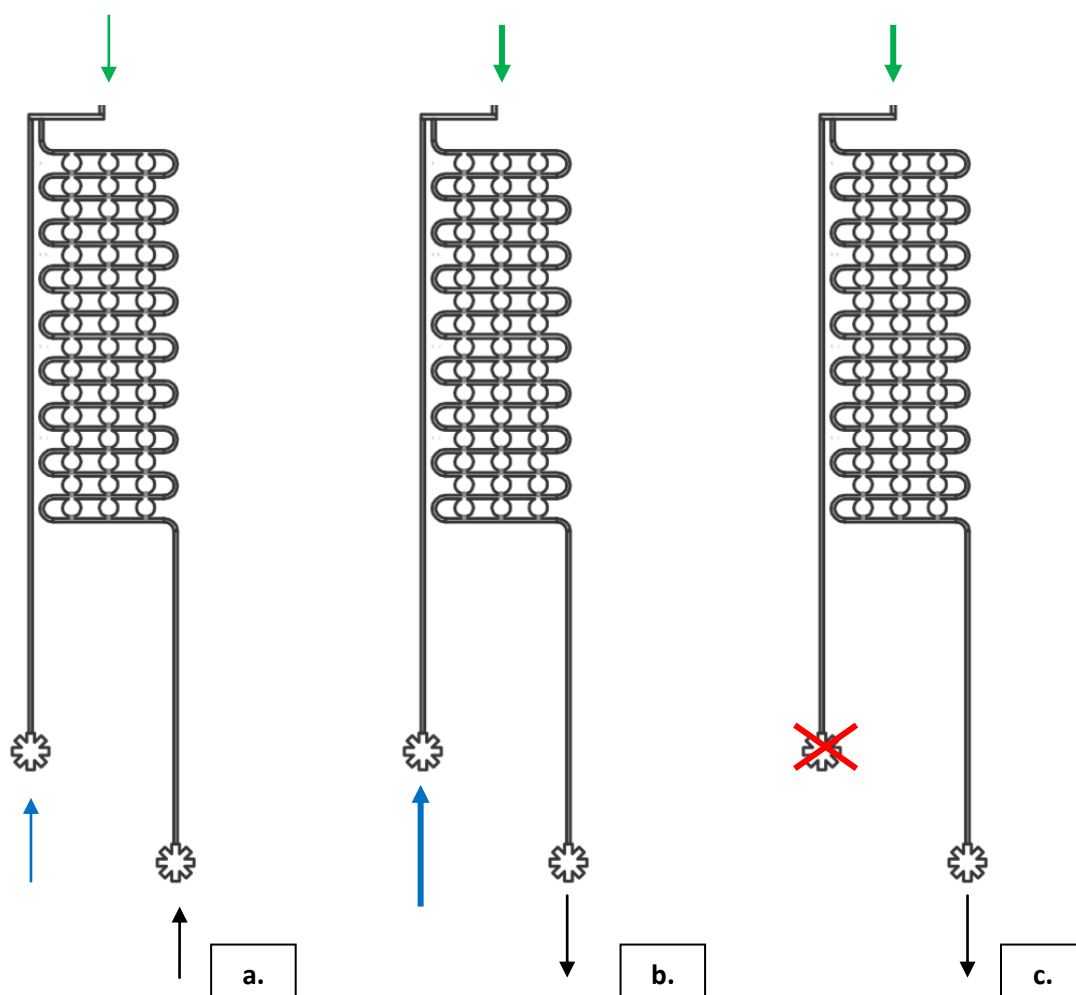


Figura 2.21 – Unità di intrappolamento costituita dalla serie di 16 unità base. **a)** In evidenza l'ingresso del canale di semina (freccia blu); l'uscita del canale di scarto (freccia nera); il canale di connessione con il generatore di gradiente (freccia verde) **b)** fase semina cellulare: ingresso cellule da canale di semina (freccia blu), perfusione ridotta da gradiente (freccia verde), scarto da canale di uscita (freccia nera) **c)** fase coltura cellulare: canale di semina bloccato (X rossa), perfusione dal generatore (freccia verde), scarto da canale di uscita (freccia nera).

Il canale a sinistra consente l'immissione delle cellule, che raggiungeranno in questo modo solo le 16 unità base poste in serie ed adiacenti al canale stesso. Al termine della serpentina, un ulteriore canale, anch'esso autonomo rispetto alle altre unità di intrappolamento, consente il passaggio e l'eliminazione degli scarti. Un disegno di questo tipo permette, quindi, di ottenere un dispositivo caratterizzato da unità indipendenti dal punto di vista della semina, della coltura e anche della trasfezione cellulare, piuttosto che di altri studi effettuabili su tale chip. In questo modo, idealmente, si possono testare 6 diverse condizioni, potendo variare sia i parametri cellulari, sia, ad esempio, le concentrazioni di vettori non virali, in vista dell'applicazione di tecniche di terapia genica.

L'effettiva autonomia è stata verificata, in modo qualitativo, seguendo il percorso di una bolla immessa nel circuito in condizioni diverse. Fin tanto che la bolla scorre entro la

serpentina caratterizzata da canali di semina e uscita non occlusi, l'autonomia delle unità è assicurata; nel momento in cui questa si direziona verso il generatore di gradiente o, addirittura, verso le altre unità di intrappolamento, che presentano invece i tubi collegati a canali di semina ed uscita chiusi tramite *clamp*, l'indipendenza non è più verificata né garantita.

Per questi test ci si avvale di una pompa a siringa, che, connessa al dispositivo d'interesse, consente di impostare la portata di fluido che scorre all'interno dei canali. In un primo esperimento, due siringhe con acqua distillata vengono collegate ai due ingressi del generatore di gradiente, in questo modo l'intero dispositivo risulta attraversato dal fluido. Isolate 5 unità di intrappolamento e quindi chiusi i rispettivi ingressi ed uscite tramite l'uso di *clamp* che ocludono i tubi in tygon ad essi collegati, si permette l'ingresso di aria attraverso un ingresso del generatore (Figura 2.22). Tramite l'uso del microscopio ottico, è possibile monitorare il percorso della bolla all'interno del circuito e studiarne il comportamento al variare delle portate in ingresso.

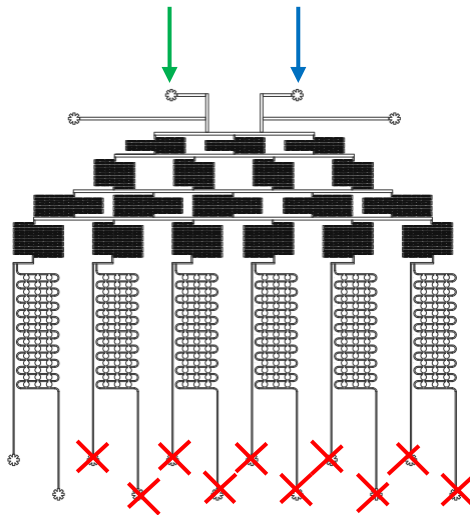


Figura 2.22– Schema della prima prova di validazione fluidodinamica. La perfusione e l'immissione della bolla avviene dagli ingressi del generatore di gradiente (freccia verde e freccia blu). 5 unità di intrappolamento sono occluse tramite *clamp* (x rosse).

Con lo stesso scopo, un'ulteriore prova viene condotta occludendo anche gli ingressi del generatore di gradiente e perfondendo attraverso il canale di semina dell'unità non vincolata da *clamp*. Anche in questo caso viene immessa una bolla, dal medesimo canale, e se ne segue il percorso a diverse portate, imposte tramite pompa a siringa (Figura 2.23).

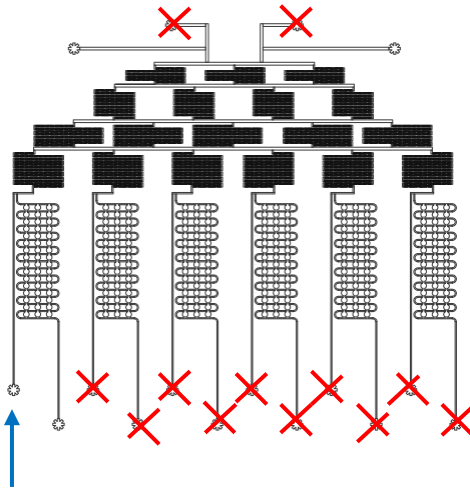


Figura 2.23– Schema della seconda prova di validazione fluidodinamica. La perfusione e l'immissione della bolla avviene dall'unica unità libera (freccia blu). Le altre 5 unità di intrappolamento e gli ingressi del generatore sono occlusi tramite clamp (x rosse).

Un ultimo test ha come obiettivo la riproduzione delle condizioni in cui il dispositivo si trova al momento della semina cellulare. Viene data in ingresso al generatore una portata molto bassa, dell'ordine dei $\mu\text{L/h}$, e, in contemporanea, si perfonde a valori più alti, dell'ordine dei $\mu\text{L/min}$, dal canale di semina dell'unità di intrappolamento libera. Successivamente si introduce una bolla nel canale di semina stesso e si controlla l'andamento variando la portata a livello dell'unità (Figura 2.24).

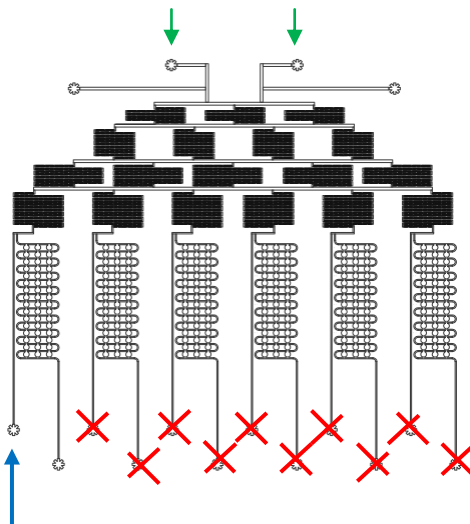


Figura 2.24– Schema della terza prova di validazione fluidodinamica. La perfusione avviene dai due ingressi del generatore (freccie verde) e l'immissione della bolla avviene dall'unica unità libera (freccia blu). Le altre 5 unità di intrappolamento sono occlusi tramite clamp (x rosse).

Tali prove consentono di stabilire il *range* di portate entro cui l'indipendenza delle unità di intrappolamento è assicurata, permettono quindi di fissare un primo limite sulle portate d'utilizzo, le quali dovranno anche rispondere ad altre esigenze d'esercizio.

2.3.2. Unità di intrappolamento: validazione funzionale

Oltre ad assicurare e mantenere l'indipendenza, il chip deve essere, infatti, caratterizzato da portate che portino ad isolare singole cellule all'interno delle camere, costituenti l'unità base. A tal riguardo sono state condotte ulteriori prove, volte a valutare la capacità di intrappolamento dei vari dispositivi progettati. Questa serie di test, oltre ad accertare il *range* di portate in grado di indirizzare una cellula verso la trappola, hanno permesso di scegliere la modalità di immissione delle cellule stesse all'interno del circuito e di selezionare le configurazioni più efficaci, che saranno successivamente utilizzate per i test biologici preliminari.

Per questa fase di validazione, il dispositivo in PDMS, prima di esser adeso al vetrino, è stato tagliato all'altezza delle uscite del generatore di gradiente, là dove queste convogliano verso la rispettiva unità di intrappolamento. Questa operazione permette di separare i due elementi, così da poter usare solo la parte d'interesse per tali prove, caratterizzata dalle unità di intrappolamento (Figura 2.25). In questo modo risulteranno facilitate le manovre di esercizio, in quanto ogni elemento sarà completamente autonomo e indipendente, eliminando la necessità di *clamp* di occlusione.

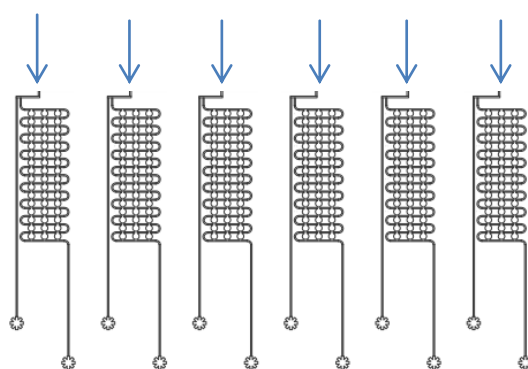


Figura 2.25- Livello del taglio con in evidenza i canali non chiusi

Dividendo il circuito però, i canali di connessione risulteranno aperti in corrispondenza del taglio (Figura 2.25). Per tale ragione si realizza un sottile strato di polidimetilsilossano in fase liquida, trasferito per contatto sul lato del dispositivo con la sezione libera del suddetto

canale. In questo modo, posto il dispositivo su piastra riscaldata e raggiunta la polimerizzazione del film, il canale verrà chiuso e l'eventuale fluido all'interno, convogliato verso la serpentina. Come si evince dalla letteratura [58, 59], questo particolare processo, noto come *stamp and stick*, si basa sull'utilizzo di PDMS non ancora reticolato come adesivo, al fine di incollare due superfici di PDMS già reticolato. In questo caso il film di 10 μ m di PDMS, ottenuto con un rapporto 10:1 (w/w) tramite *spin coating* su wafer di silicio, permette di sigillare la faccia laterale del chip non isolata a causa del taglio apportato.

Gli esperimenti sono stati inizialmente condotti con sfere di polistirene di diametro di 10 μ m, atte a simulare le cellule. Queste micro particelle in polistirene sono fornite in sospensione e per poterne ottenere la concentrazione desiderata, presentando una carica superficiale positiva, vengono diluite in acqua distillata. Al fine di ridurre le interazioni idrofobiche che si instaurerebbero con il PDMS e le forze attrattive che le sfere esercitano su loro stesse, alla sospensione viene aggiunto una sostanza tensioattiva. Il dodecilsolfato di sodio (SDS), un tensioattivo anionico, e il triton, tensioattivo non ionico, diluiti rispettivamente al 1% (peso/volume) e 0.1% (volume/volume) in PBS, sono le sostanze usate per i test.

L'inserzione di fluidi o sospensioni all'interno di un dispositivo microfluidico, può avvenire sfruttando meccanismi passivi, in particolare la tensione superficiale, ma per la maggior parte delle applicazioni, si ricorre generalmente a componenti esterni. Tipicamente vengono impiegate pompe a siringa ma difficilmente è possibile agire su più di 2 ingressi contemporaneamente. Le elevate perdite di carico delle unità di intrappolamento hanno, però, permesso l'utilizzo di un controllo in pressione, tramite strumentazione relativamente economica. Infatti si è utilizzato uno sfigmomanometro che, collegato a una rampa a sei accessi, ha permesso di collegare tutti gli ingressi dei canali di semina in contemporanea.

Per ognuna delle sei unità, la sospensione di sfere che si vuole iniettare nel dispositivo viene manualmente aspirata tramite una siringa all'interno di un tubo in tygon. Quest'ultimo, tramite un *pin* metallico, viene connesso all'ingresso del canale di semina e all'estremità opposta ad un ingresso della rampa dello sfigmomanometro. Tramite la valvola, di cui è dotato lo sfigmomanometro, è possibile gestire il valore di pressione che viene imposto alla sospensione presente nel tubo. Variando il valore di pressione in

ingresso, si modifica così la velocità del fluido stesso. In questo modo si ricava il *range* ottimale di pressione che consente un intrappolamento efficace. Tramite l'ausilio del microscopio ottico Nikon SMZ 1000, dotato di telecamera collegata al calcolatore, è stato possibile monitorare l'intero processo e seguire il percorso di ogni sfera che passa nella serpentina.

Per poter valutare l'efficienza di intrappolamento, è stato calcolato il numero di singole sfere catturate all'interno di una singola unità di intrappolamento. Questo è stato poi rapportato al numero massimo di sfere intrappolabili, pari al numero di camere presenti all'interno dell'unità stessa.

In un secondo momento, tali esperimenti sono stati condotti, in condizioni simili, ricorrendo a cellule tumorali immortalizzate altamente stabilizzate, le Hela (diametro medio 16,6 μ m). Queste ultime, inizialmente utilizzate anche in fase di validazione biologica, mostrano dimensioni compatibili con i dispositivi caratterizzati da un canale principale largo 50 μ m e una trappola di 10 μ m. Per seguire il percorso delle cellule immesse nel canale principale si è ricorsi a una fotocamera per riprese ad alta velocità. Tale operazione ha consentito di acquisire 4 immagini a *time point* diversi (da 0 a 240 ms con *step* di 80ms) per valutare il comportamento di due cellule in ingresso al canale principale.

In questa fase preliminare si è voluta valutare la capacità del dispositivo di intrappolare una singola cellula, senza constatarne l'effettiva vitalità. Per tale ragione le cellule sono state risospese in PBS, filtrato in modo da eliminare particolato o detriti che causerebbero l'occlusione dei canali. Inoltre, per prevenire l'aggregazione cellulare, ad esse è stato addizionato acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) in una concentrazione pari a 1,5 mMol: questa molecola funziona come chelatore del Ca prevenendo così l'adesione cellula-cellula e assicurando che queste scorrano singolarmente all'interno dei tubi e successivamente nei canali [60]. Al medesimo scopo, in altre prove, alla sospensione cellulare in PBS è stata additivata una proteina del plasma, albumina di siero bovino (BSA) all' 1%.

Anche in questo caso, la sospensione è stata aspirata manualmente all'interno del tubo, collegato da un lato all'ingresso del canale di semina e dall'altro alla rampa, connessa con lo sfigmomanometro. Tramite microscopio è stato possibile osservare il comportamento

delle cellule al variare della pressione imposta e confrontare tali risultati con quelli previsti da simulazioni.

2.3.3. Generatore di gradiente: validazione fluidodinamica

La prima fase di validazione del generatore di gradiente è volta alla verifica della corretta progettazione dello stesso. Le prime prove sono condotte al fine di valutare la fluidodinamica che caratterizza il generatore di gradiente, per verificare che le ripartizioni di portata all'interno dei diversi rami risultassero corrette. Per far ciò, una volta impostata la portata nei due ingressi, sono state misurate e confrontate tra loro le sei portate in uscita, per verificare che fossero uguali tra loro e corrispondessero effettivamente a quella ottenuta tramite calcoli fluidodinamici in fase di progettazione.

Tali esperimenti sono stati condotti tramite l'ausilio della pompa a siringa, alla quale vengono collegati gli ingressi del generatore stesso. Riempito il circuito di acqua distillata e debollato, i tubi collegati ai canali di semina delle unità di intrappolamento vengono occlusi tramite l'uso di una *clamp*. Questa operazione fa sì che in quella direzione non ci sia flusso e tutto il fluido proveniente dal generatore venga convogliato verso le serpentine, quindi verso il canale di uscita. Ultimati tali passaggi, si arresta la pompa a siringa. A questo punto ai tubi connessi con i canali di uscita viene aggiunto, tramite *pin*, un ulteriore tratto in tygon. Impostato l'intervallo di tempo dopo il quale si vuole effettuare la misura, si dà avvio alla pompa a siringa alla portata che si vuole studiare e si visualizza l'andamento del menisco all'interno dei tubi addizionali, determinandone la lunghezza del tratto di tubo percorsa in un tempo predeterminato. Terminato l'esperimento, si può calcolare il volume di fluido contenuto all'interno del tubo aggiunto, a partire dal diametro dello stesso e dalla lunghezza percorsa dall'acqua. Ottenuto il volume, si ricava la portata di fluido all'interno del tratto, che corrisponde a quella in uscita dal generatore, dal momento che da ciascuna uscita di quest'ultimo il fluido è convogliato verso la rispettiva uscita delle unità di intrappolamento. Trovati tali valori è possibile confrontarli con quelli calcolati in precedenza, oltre che paragonarli tra loro valutandone eventuali differenze. Tali analisi sono state condotte utilizzando il test statistico One way ANOVA seguito dal test post-hoc di Bonferroni, utilizzando il *software* GraphPad Prism v5.00.

2.3.4. Generatore di gradiente: validazione funzionale

Verificata la corretta ripartizione delle portate, al fine di valutare l'effettiva capacità del generatore di creare un gradiente lineare, sono stati condotti una serie di test per valutare qualitativamente e quantitativamente le concentrazioni in uscita delle soluzioni immesse in ingresso, e quindi il rapporto di miscelamento.

Per questa fase di validazione, il dispositivo in PDMS, prima di esser adeso al vetrino, è stato forato al di sotto delle uscite del generatore di gradiente, oltre i canali di connessione che convogliano verso la rispettiva unità di intrappolamento, con una fustella di diametro 3mm (Figura 2.26). Questa operazione ha permesso di creare dei pozzetti di raccolta in uscita al gradiente stesso con volume di circa 30 μ L, impedendo, contemporaneamente, il passaggio di fluido verso le unità di intrappolamento.

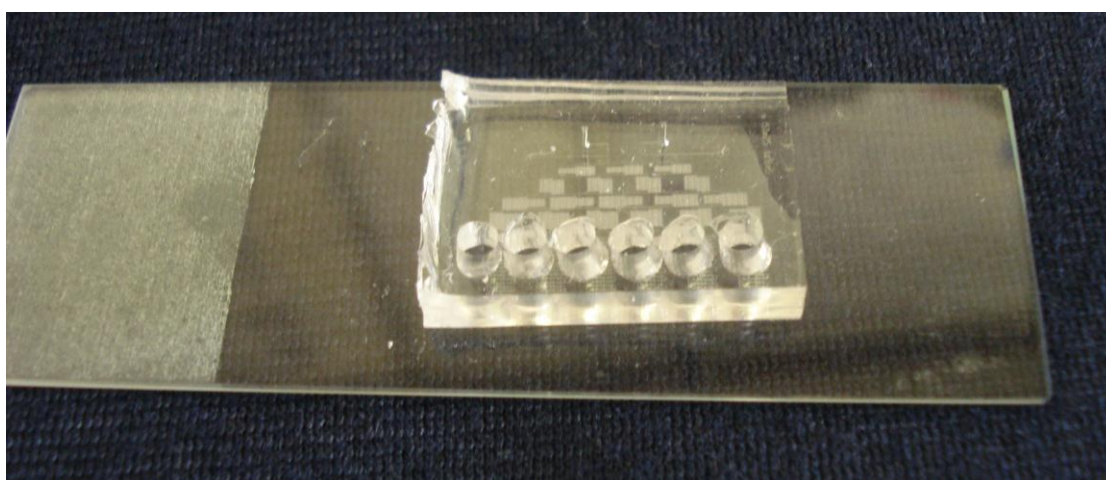


Figura 2.26- Dispositivo con pozzetti

I primi test colorimetrici sono stati condotti iniettando, tramite pompa a siringa, due diversi coloranti alimentari da ciascun ingresso, alla portata di interesse. Una volta che il dispositivo risulta riempito di fluido e privo di bolle, raggiunta una situazione di regime, il volume accumulato nel pozzetto è stato raccolto e studiato con spettrofotometro NanoDrop2000. Già visibilmente si può avere un'idea dell'avvenuto *mixing*, ma una misura quantitativa permette di stabilire con certezza la linearità del gradiente stesso. Lo spettrofotometro misura l'assorbimento luminoso come funzione della lunghezza d'onda della radiazione luminosa. Stabilita la lunghezza d'onda del colorante utilizzato, che corrisponde a quella caratterizzata dall'assorbimento maggiore, si effettuano le misure, a quella stessa lunghezza d'onda, relative a tutti i campioni raccolti. Per ogni volume

accumulato nel pozzetto si effettuano 3 misure. I risultati ottenuti in termini di media e deviazione standard vengono poi confrontati con quelli di campioni di controllo ottenuti miscelando a mano i coloranti nelle determinate proporzioni e analizzati tramite t test con il *software* GraphPad.

Questi test hanno permesso di verificare e quantificare il *mixing* di sostanze caratterizzate da un elevato coefficiente di diffusione. Il generatore è stato progettato, però, per creare un gradiente di molecole di dimensioni consistenti.

Per tale ragione, sono stati eseguiti ulteriori esperimenti utilizzando condrociti nasali GFP (diametro medio di 10 μ m), risospesi in EDTA 2mMol per evitarne l'aggregazione. La sospensione cellulare viene immessa attraverso uno dei due ingressi del generatore mentre all'altro ingresso viene collegata una siringa di PBS. Raggiunta una situazione di regime, le cellule accumulate nei pozzetti vengono lasciate sedimentare per 1h in incubatore. Trascorso tale periodo, vengono acquisite immagini tramite microscopio a fluorescenza.

2.4 Validazione biologica preliminare: coltura cellulare

Verificata la fluidodinamica interna e valutata la funzionalità dei due elementi caratterizzanti il dispositivo, sono state condotte prove cellulari preliminari, finalizzate alla valutazione della citocompatibilità dello stesso.

Per questa fase di validazione, i chip, prima del loro utilizzo, sono stati sottoposti a un ciclo di sterilizzazione in autoclave, che sfrutta l'azione del vapore saturo per eliminare microrganismi mediante la denaturazione di loro proteine e altre biomolecole. Questo perché le cellule sono molto sensibili ai parametri chimico-fisici dell'ambiente in cui si trovano, in quanto la loro sopravvivenza risulta influenzata dal rischio di contaminazione batterica. Terminata tale operazione, i chip vengono posti in stufa a 65°C per almeno 12 ore, perché sia assicurata la totale eliminazione di vapore acqueo. Per la medesima ragione anche i *pin* metallici sono sottoposti ad un ciclo di autoclave e i tubi subiscono un lavaggio in etanolo e PBS.

Nonostante il PDMS sia un materiale biocompatibile, esso non si presenta ideale per la coltura cellulare a causa delle scarse proprietà di adesione e della sua idrofobicità. Esso, in presenza di acqua, risulta infatti caratterizzato da bassa energia superficiale,

termodinamicamente legata all'adesione ad un substrato solido di cellule sospese in un fluido. Per tale ragione il dispositivo, prima di essere utilizzato, deve essere trattato e rivestito da un *coating* in grado di promuovere l'adesione cellulare.

A tal fine i chip vengono, dapprima, pretrattati e attivati tramite l'azione del plasma, che ne varia la composizione chimica superficiale aumentando temporaneamente l'idrofilicità. Questa modifica superficiale impiega gas, quali ossigeno, azoto e idrogeno, che si dissociano e reagiscono con la superficie del substrato, creando gruppi chimici funzionali. Successivamente, sotto cappa a flusso laminare, per evitare eventuali contaminazioni e preservare la sterilità, ai dispositivi vengono addizionati i *pin* a cui sono collegati i tubi in tygon, sia agli ingressi in corrispondenza del generatore, sia alle uscite delle unità di intrappolamento, lasciando liberi i fori relativi ai canali di semina. Terminate tali operazioni, i dispositivi vengono ulteriormente trattati, al fine di favorire l'adesione cellulare, con poli-L-lisina (PLL) allo 0.1% (w/v) in PBS, che ne altera la carica superficiale [18]. Per far ciò, gli ingressi del generatore di gradiente vengono collegati alla pompa, su cui sono montate due siringhe con la sospensione di PLL. Fin tanto che il dispositivo non risulta interamente riempito dal fluido e privo di bolle, la portata viene mantenuta nell'ordine dei $\mu\text{L}/\text{min}$, proprio per velocizzare le operazioni, dopo di che viene abbassata a $30\mu\text{L}/\text{h}$ e mantenuta per l'intera durata del trattamento. Il dispositivo viene posto in incubatore per 1 h, tempo richiesto per la formazione di un *coating* uniforme sulla superficie di PDMS. Trascorso tale periodo il chip viene perfuso con PBS in una quantità e per un tempo tale da permettere la rimozione della PLL residua. Ultimati questi passaggi, si riempie il dispositivo con il mezzo di coltura, specifico della linea cellulare utilizzata.

Prima di procedere con le prove di coltura, sono stati condotti studi alla macroscale volti alla verifica della sopravvivenza dei tipi cellulari a disposizione, a diverse diluizioni. Seguendo procedure di semina standard, le cellule sono state piastrate all'interno di *flask* a una densità iniziale pari a $10000\text{ cells}/\text{cm}^2$. Tale parametro è stato dimezzato per 5 volte, fino a una densità cellulare di $312\text{ cells}/\text{cm}^2$, per valutare ad ogni *step* il comportamento delle cellule al diminuire della loro concentrazione. Saggi di vitalità cellulare sono stati eseguiti dopo 2h dalla semina e al giorno 3 e 4. Tali studi hanno permesso di constatare il comportamento dei diversi tipi cellulari in condizione di isolamento e capire quale tipo risultasse ottimale per colture di singola cellula.

Per questa prima fase di validazione, sono state utilizzate quindi cellule U87, una linea di cellule di glioblastoma umano primario. Il mezzo di coltura specifico risulta costituito da DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), 10% siero fetale bovino (PSG), 1% Penicillina-Streptomicina (antibiotici), 1% di sodio piruvato e 10 mM HEPES (acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinil-etansolfonico, per mantenere stabile il pH).

Una volta che il dispositivo risulta interamente attraversato dal mezzo di coltura, si può passare alla fase di semina cellulare. La portata in ingresso al gradiente del medium viene fissata a 30 $\mu\text{L}/\text{h}$, valore di perfusione mantenuto durante l'intero periodo della coltura. Tale portata, dividendosi lungo i rami del generatore, assicura una perfusione pari a 10 $\mu\text{L}/\text{h}$ alle diverse unità di intrappolamento. Risultando il canale di semina di ciascuna di esse caratterizzato da minore resistenza, se paragonato alla serpentina dove le cellule vengono intrappolate, solo l'1% di tale portata arriva alle cellule stesse. Queste sono, quindi, raggiunte da una portata pari a 1 $\mu\text{L}/\text{h}$, valore che evita la generazione di sforzi di taglio problematici assicurando però un adeguato ricambio del mezzo [44]. A questo punto si preleva manualmente la sospensione cellulare, tramite siringa, all'interno di tubi tygon. Questi vengono collegati all'ingresso del canale di semina di ciascuna unità di intrappolamento, e, dal lato opposto, alla rampa connessa con lo sfigmomanometro. Impostato il valore di pressione desiderato, aperto il rubinetto della rampa, si attendono circa 6 minuti al termine dei quali i tubi vengono staccati dallo sfigmomanometro (Figura 2.27)

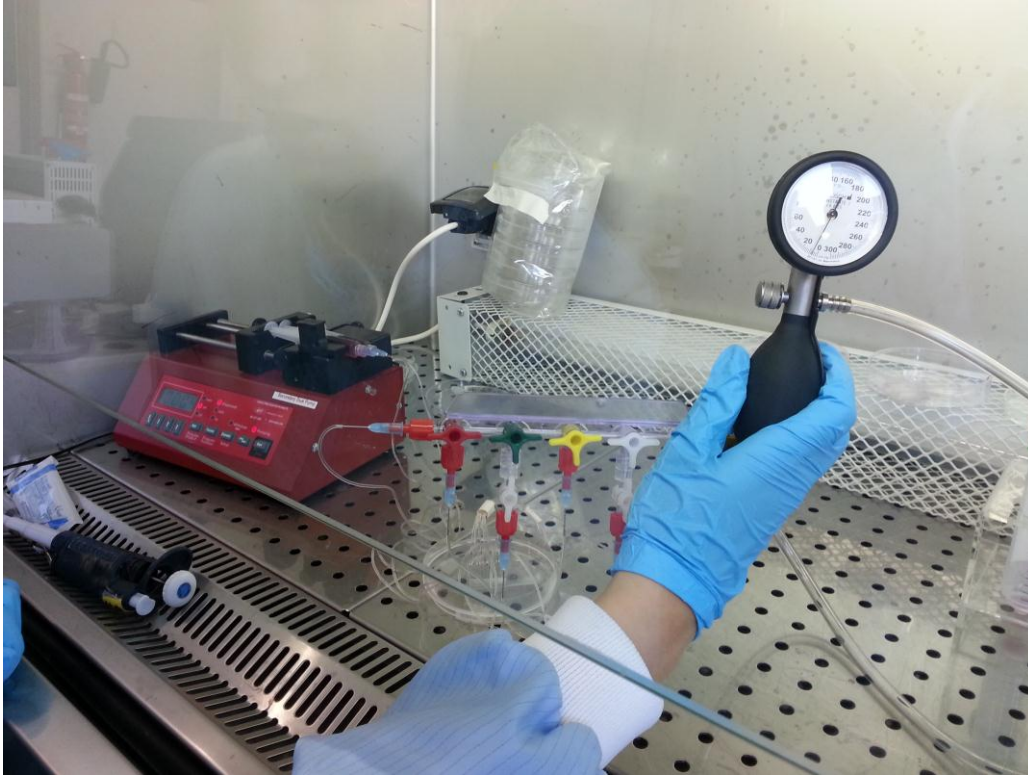


Figura 2.27- Set up sperimentale: pompa a siringa collegata al generatore; sfigmomanometro collegato alla rampa a sua volta connessa tramite tubi in tygon ai canali di semina delle unità di intrappolamento.

Avvenuta la semina, si controlla il dispositivo al microscopio, per constatare l'effettivo intrappolamento delle cellule all'interno delle camere, e lo si ripone in incubatore (37°C, 5% CO₂ e 20% O₂). Il chip viene controllato inoltre dopo 4, 24, 48 e 72 h per verificare lo stato di salute delle cellule e il loro cambiamento morfologico.

Il protocollo di coltura è, al momento, ancora in fase di ottimizzazione.

3.RISULTATI

3.1. Progettazione del dispositivo microfluidico

In questo capitolo verranno presentati i risultati relativi alle analisi agli elementi finiti eseguite sull'unità base di intrappolamento, composta da una successione di 3 camere di coltura, e sul generatore di gradiente. Tali studi hanno permesso di individuare, per quanto riguarda l'unità di intrappolamento, gli intervalli dimensionali ottimali per tutte le *features* che la caratterizzano, portando alla definizione di 7 varianti CAD del medesimo dispositivo, caratterizzati da diversi valori di larghezze di canali (50,75 e 100 μm) e trappole (8,10 e 15 μm). Inoltre, hanno consentito di definire il numero di unità HB necessarie al generatore per ottenere il *mixing* desiderato, oltre che progettare l'intero elemento, il cui disegno si mantiene costante per tutte le versioni.

3.1.1. Unità di intrappolamento: dimensionamento geometrico e simulazioni fluidodinamiche computazionali

Il dimensionamento geometrico del dispositivo microfluidico è stato eseguito combinando determinate specifiche di progetto e di fabbricazione, con i risultati ottenuti da analisi computazionali tramite modellizzazione *Comsol*, come descritto nei materiali e metodi. Fissati i valori delle altezze relative a canali, trappole e camere di coltura, oltre a quello del diametro di queste ultime, è stato disegnato il modello 3D della unità di base, definito in modo parametrico così da poterne modificare i valori delle dimensioni di interesse per valutare i diversi risultati ottenibili in termini di efficacia di intrappolamento.

Le analisi computazionali hanno permesso di ricavare:

1. la ripartizione della portata tra le camere al variare di quella in ingresso al canale principale,
2. il valore della Q_{lim} al variare della larghezza dei canali,
3. la distribuzione della portata tra le camere al variare della configurazione in cui esse si trovano e il confronto con le Q_{lim} precedentemente ricavate,
4. le perdite di carico lungo l'unità di base,

Distribuzione della portata in ingresso alle camere al variare della portata totale

Per stimare la ripartizione della portata in ingresso alle 3 camere rispetto a quella totale immessa nell'unità sono state condotte analisi fluidodinamiche variando la portata entrante tra 0,2 e 20 μ L/min. Dal momento che questa si ripartisce, rispetto a quella totale in ingresso al circuito, in quote parti diverse in base alla larghezza del canale principale stesso e alla larghezza delle trappole, vengono studiate tutte le combinazioni possibili, rispetto ai valori di larghezze selezionate. Si riportano i soli risultati relativi alle unità caratterizzate da trappole pari a 10 μ m, in quanto ritenuti i più significativi in base a studi successivi (Figura 3.1).

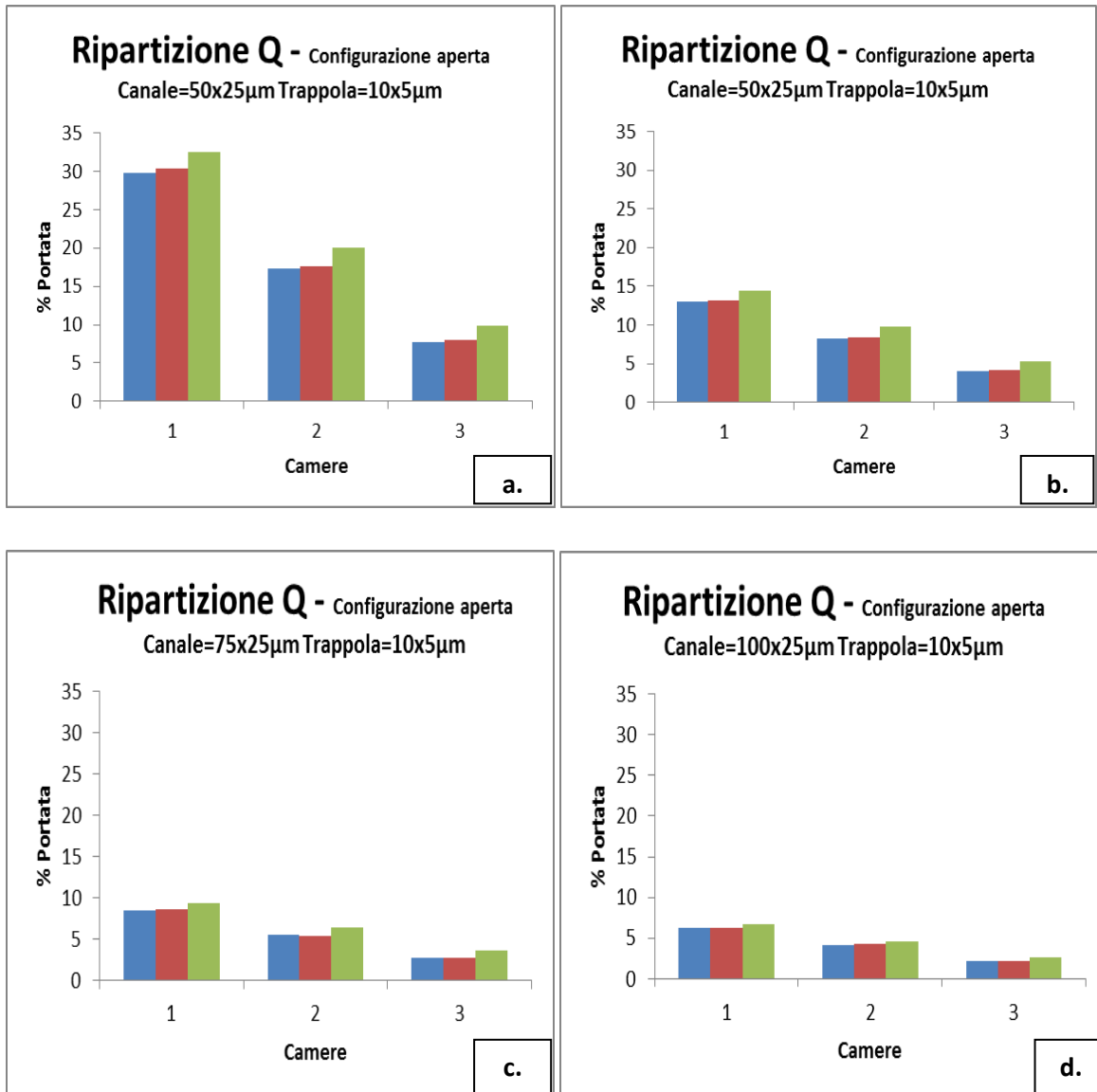


Figura 3.1- Ripartizione del flusso all'interno dell'unità base, in configurazione aperta. Grafici relativi a dispositivi caratterizzati da trappola larga 10 µm: **a)** canale largo 25µm **b)** canale largo 50µm **c)** canale largo 75µm **d)** canale largo 100µm. I risultati mostrano la % di portata in ingresso alle singole camere rispetto a quella totale immessa nell'unità, al variare della portata data in ingresso al canale principale.

■ Q=0.2µl/min
■ Q=2µl/min
■ Q=20µl/min

Come si evince dal grafico, aumentando di un ordine di grandezza la portata data in ingresso al canale principale, la porzione in ingresso alla singola camera cresce lievemente, a parità di altre condizioni. La portata pari a 20 µL/min, però, determinando una caduta di pressione consistente ai capi del circuito e limitando di conseguenza la ripetibilità in serie dell'unità di intrappolamento, non viene ulteriormente esaminata (in fase sperimentale, si riscontrano buoni risultati di intrappolamento con portata pari a 2µL/min, per tale ragione i prossimi risultati verranno riferiti a tale valore).

Si riscontra inoltre una diminuzione di portata tra la prima camera e le successive, a parità di larghezza del canale. Aumentando, invece, il valore di quest'ultima si nota una diminuzione della % di portata in ingresso alle camere.

Individuazione della Q_{lim}

Una volta analizzata l'influenza della portata sulla ripartizione della stessa tra le camere, per poter scegliere la combinazione di canale principale e trappola ottimale, sono stati definiti degli indici di efficienza che permettessero di confrontare le diverse combinazioni possibili, ottenendo un dimensionamento geometrico adeguato. A tal fine è stata condotta, per ciascuna larghezza del canale principale selezionata, una simulazione su di un semplice canale rettangolare, che permettesse di ricavare la portata minima che si deve garantire in entrata alla camera, perché si abbia ipoteticamente l'ingresso di almeno una cellula. Tale portata corrisponde alla *streamline* appartenente alla regione di fluido vicino alla parete inferiore, distante dalla parete stessa a meno del raggio di una cellula (linea arancione Figura 2.3 Materiali e Metodi paragrafo 2.1.1). A regimi di Re molto bassi, infatti, le particelle sferiche non si scostano dalla linea di flusso passante (ipoteticamente) per il loro centro di massa. La Q_{lim} così definita è quindi dipendente dal diametro delle cellule utilizzate. Da queste analisi è stato, quindi, possibile ottenere una soglia teorica (Q_{lim}), al di sopra della quale può esserci intrappolamento, in quanto dovrebbe essere consentito l'ingresso di almeno una cellula, e al di sotto della quale la camera viene invece bypassata, dal momento che la portata in ingresso si presenta inferiore a quella minima perché entri una cellula. I valori della Q_{lim} in percentuale rispetto alla portata totale in ingresso al canale, ricavata al variare delle dimensioni sia del canale principale sia del diametro delle cellule, sono riportati in tabella 3.1.

	Raggio cellule [μm]			
	5	6	7	8
<i>Qlim</i> (L=25μm)	8,59%	11,12%	13,75%	16,36%
<i>Qlim</i> (L=50μm)	3,55%	4,76%	6%	7,33%
<i>Qlim</i> (L=75μm)	2,23%	2,97%	3,82%	4,68%
<i>Qlim</i> (L=100μm)	1,63%	2,17%	2,81%	3,44%

Tabella 3.1- Valori di *Qlim* per le diverse larghezze di canali considerate e per cellule di diametro variabile.

Accanto al caso generale, che considera cellule con diametro pari a 10 μm corrispondente al valore di diametro medio cellulare, si sono analizzate situazioni diverse caratterizzate da diametro cellulare crescente, fino ad un valore pari 16 μm , corrispondente al diametro medio delle cellule Hela, utilizzate nelle successive fasi di validazione. Al crescere delle dimensioni della cellula, corrisponde un aumento della porzione di portata, che va diminuendo invece, a parità di diametro cellulare, per canali sempre maggiori. Per semplicità, nelle simulazioni successive si sono considerate le *Qlim* relative a cellule aventi dimensioni limite, ovvero raggio 5 e 8 μm .

Determinazione della percentuale di portata in ingresso alle camere dell'unità

Si valuta, in seguito, la ripartizione della portata nelle camere di coltura al variare delle dimensioni del canale principale, mantenendo costante la portata in ingresso, considerata pari a 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ (portata utilizzata in fase di semina cellulare). Si riportano i risultati ottenuti per tutte le larghezze di trappole considerate, in modo da poter constatare l'influenza di tali parametri sulla distribuzione della portata stessa. Si considera inoltre la percentuale di portata che bypassa le camere e continua a scorrere lungo il canale principale. Nel grafico in figura 3.3 si riportano i valori percentuali delle portate in ingresso alle tre camere e al canale principale, valutati rispetto a quella totale entrante nell'unità, in configurazione aperta.

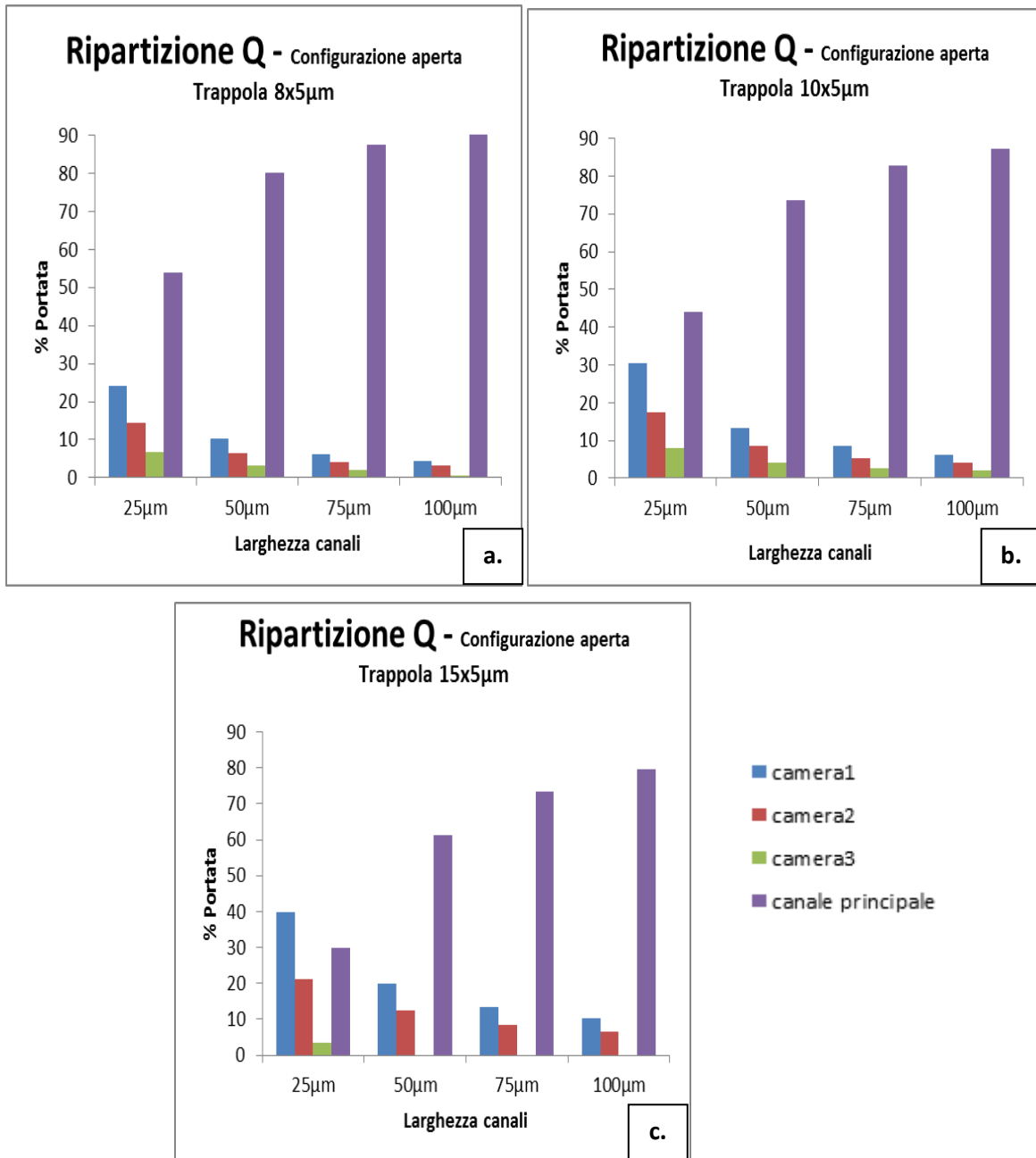


Figura 3.3- Ripartizione del flusso all'interno dell'unità base in configurazione aperta. Grafici relativi a dispositivi perfusi in ingresso con portata pari a 2 μ L/min. **a)** trappola larga 8 μ m **b)** trappola larga 10 μ m **c)** trappola larga 15 μ m . I risultati mostrano la % di portata in ingresso alle singole camere e del canale principale rispetto a quella totale immessa nell'unità, al variare della larghezza del canale principale (25-100 μ m) e in assenza di occlusioni.

A parità di larghezza del canale, si riscontra una diminuzione della portata in ingresso tra la prima camera e le successive. All'aumentare della medesima grandezza, invece, si evidenzia una diminuzione della portata in ingresso alle camere di coltura, a favore della percentuale di portata che continua a percorrere la serpentina, la quale subisce un

incremento. Inoltre, all'aumentare delle dimensioni della trappola, per uno stesso canale, si nota in ingresso alle singole camere una % di portata maggiore.

Ripartizione della portata in camere occluse da cellule

Per poter valutare l'effetto che una trappola occlusa (e quindi un aumento di resistenza della relativa camera) determina sulla distribuzione della portata tra le camere di coltura, si conducono analisi computazionali che permettono di valutare la distribuzione di portata in caso di configurazione aperta ed occlusa. Nel grafico in figura 3.4 si riportano i valori percentuali delle portate in ingresso alle camere al variare delle possibili situazioni:

- a- unità aperta (nessuna camera contenente cellule);
- b- prima camera occlusa;
- c- prime due camere occluse;
- d- tutte le camere occluse.

Si valuta l'andamento per le diverse dimensioni di canale e trappola e si riportano i dati relativi alla sola trappola larga $10\mu\text{m}$ (larghezza ritenuta più significativa in base a studi successivi) e portata in ingresso pari a $2\mu\text{L}/\text{min}$ (portata d'utilizzo in fase di semina cellulare).

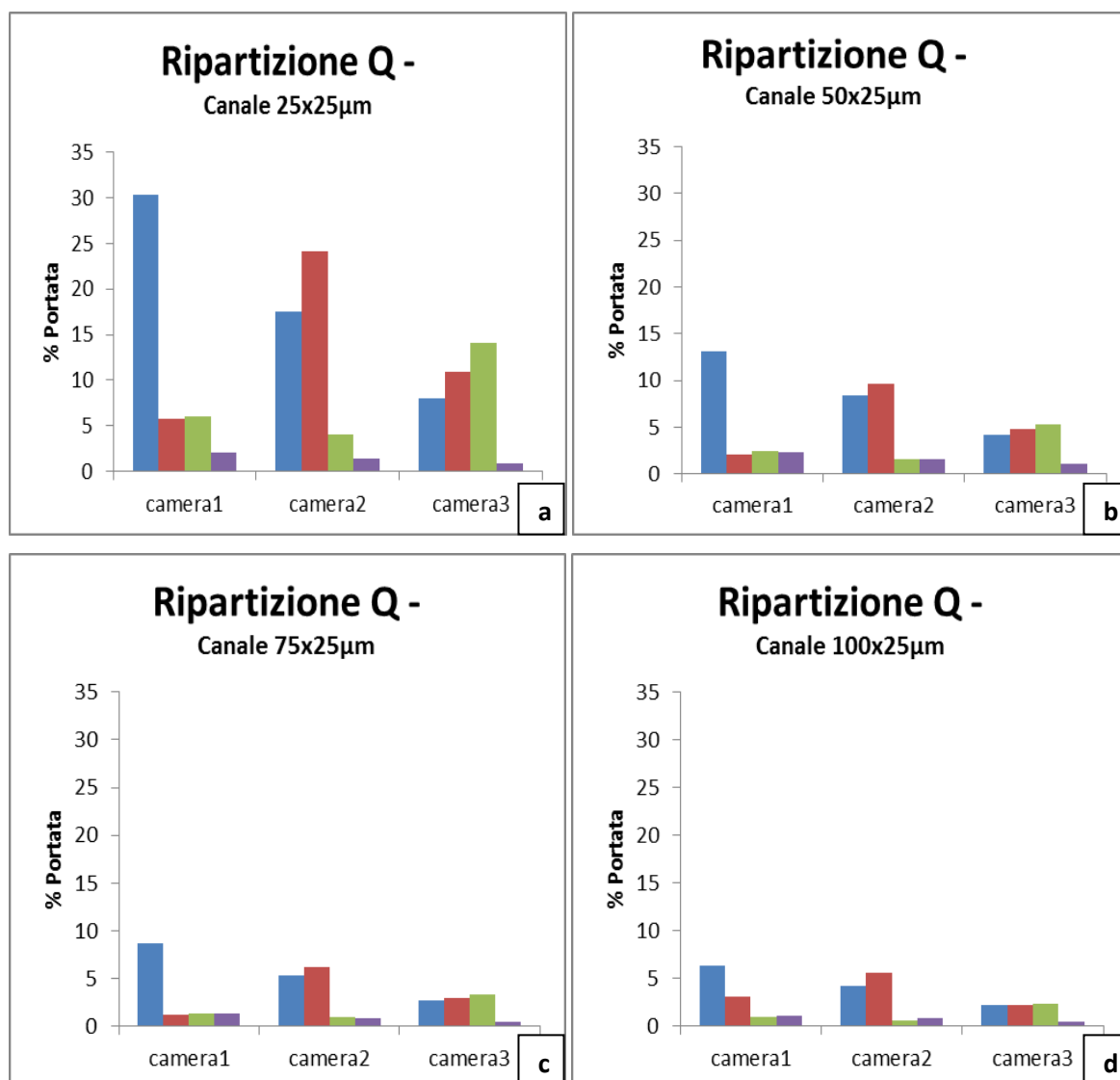


Figura 3.4- Ripartizione del flusso all'interno dell'unità base in configurazione aperta ed occlusa. Grafico relativo a dispositivi caratterizzati da trappola larga $10\mu\text{m}$ e perfusi in ingresso con portata pari a $2\mu\text{L}/\text{min}$. **a)** canale $25\mu\text{m}$ **b)** canale $50\mu\text{m}$ **c)** canale $75\mu\text{m}$ **d)** canale $100\mu\text{m}$. I risultati mostrano la % di portata in ingresso nelle 3 camere rispetto a quella totale immessa nell'unità, al variare della larghezza del canale principale ($25\text{-}100\mu\text{m}$) e della configurazione in cui si trova il dispositivo stesso.

La percentuale di portata in ingresso alla singola camera diminuisce quando questa risulta occlusa da una sfera. Le camere libere, a valle di quella occlusa, sono raggiunte invece da una portata maggiore rispetto al caso di configurazione aperta.

La situazione di occlusione con una sola sfera è stata ulteriormente approfondita studiando il comportamento di sfere di dimensioni diverse. Tutte le combinazioni di canale ($25, 50, 75$ e $100\mu\text{m}$) e trappola ($8, 10$ e $15\mu\text{m}$) sono state, quindi, analizzate in: configurazione aperta, camera 1 occlusa con sfera di diametro pari a $10\mu\text{m}$, camera 1 occlusa con sfera di

diametro pari a $16\mu\text{m}$. Nel grafico in figura 3.5, si riportano i valori percentuali delle portate in ingresso alla prima camera, nei vari casi. Si rappresentano i valori delle Q_{lim} , ricavate nel caso di cellule con diametro 10 e $16\mu\text{m}$, come linee soglia per permettere il confronto con la ripartizione appena citata (in rosso la Q_{lim} per cellule con diametro pari a $10\mu\text{m}$, in verde per cellule con diametro pari a $16\mu\text{m}$).

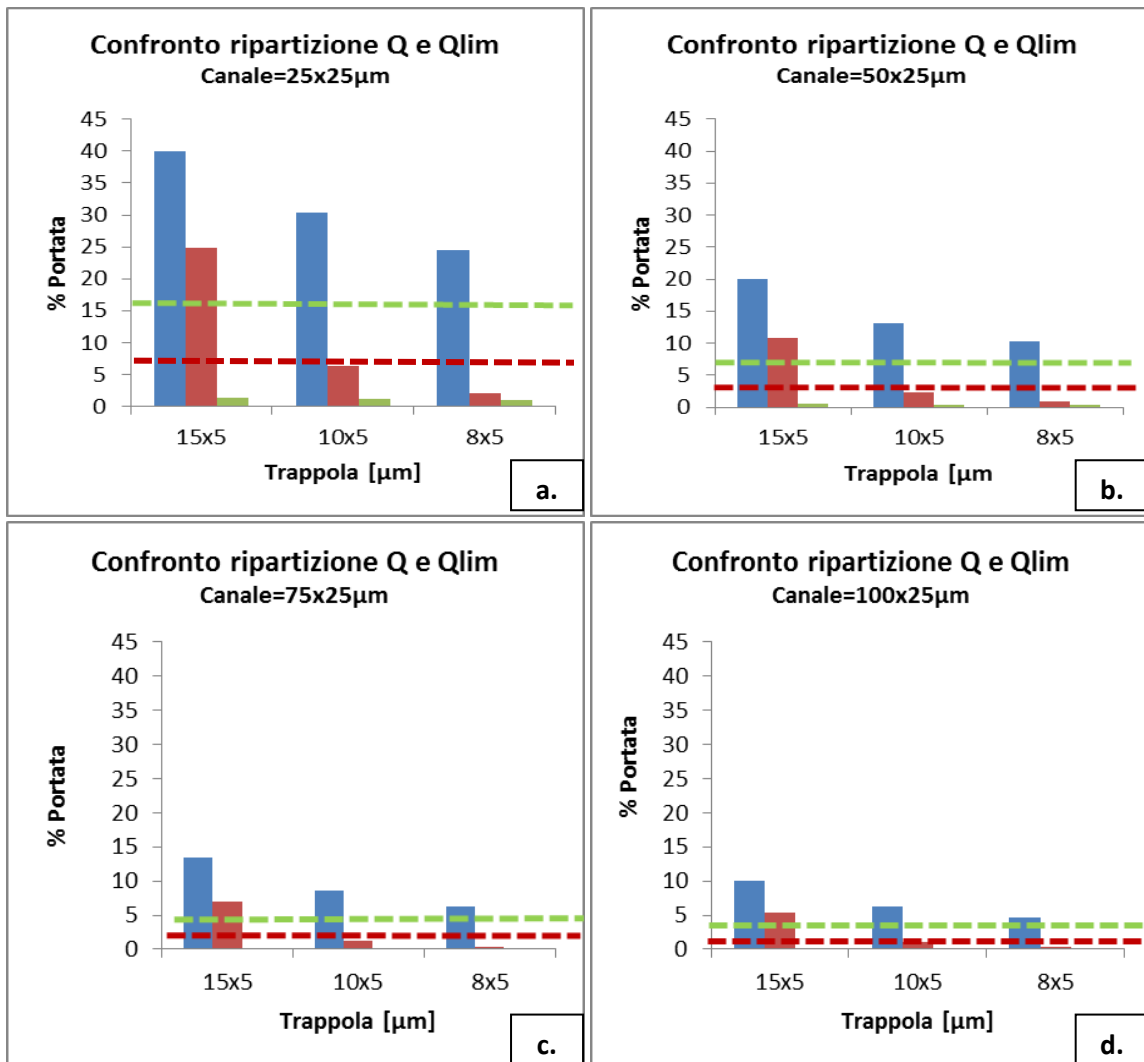


Figura 3.5- Ripartizione del flusso all'interno dell'unità base in configurazione aperta ed occlusa (una sola camera occlusa da cellula di diametro 10 e 16 μm) confrontata con Q_{lim} , al variare della larghezza della trappola. Grafici relativi a dispositivi perfusi in ingresso con portata pari a 2 μL/min. **a)** Canale=25x25 μm **b)** Canale=50x25 μm **c)** Canale=75x25 μm **d)** Canale 100x25 μm. Si rappresenta la % di portata in ingresso alla prima camera rispetto a quella totale immessa nell'unità, confrontata con i due valori di Q_{lim} (per cellula con diametro 10 e 16 μm), al variare della configurazione in cui si trova il dispositivo stesso.

- Conf. Aperta
- Conf. Occlusa (r=8 μm)
- Conf. Occlusa (r=8 μm)
- - - Q_{lim} (r=5 μm)
- - - Q_{lim} (r=8 μm)

Come già evidenziato, si ha una diminuzione di portata in ingresso alla prima camera con il diminuire della grandezza della trappola e l'aumentare della grandezza del canale principale. La percentuale di portata diminuisce, inoltre, quando la camera è occlusa da una sfera e tale riduzione risulta più consistente con l'aumentare delle dimensioni della sfera stessa. Si nota inoltre che la Q_{lim} è maggiore per sfera di raggio inferiore e assume valori più alti per canali di dimensioni maggiori.

Analisi della ripartizione della portata all'interno dell'unità rispetto alla Qlim

Come mostrano i diversi grafici (Figura 3.5), le portate in ingresso alle camere in configurazione aperta, per tutte le combinazioni di canali e trappole, risultano maggiori di entrambe le soglie. Questo significa che tutte le configurazioni analizzate sono compatibili con l'intrappolamento di cellule del *range* dimensionale scelto (10-16 μ m). Al contrario, la percentuale di portata in ingresso in configurazione occlusa con sfera di 16 μ m di diametro, risulta sempre minore della relativa Qlim. Questo implica che nessun'altra cellula, teoricamente, può entrare nelle camere (capacità di isolare una sola cellula). Per quanto riguarda la configurazione occlusa con sfera di diametro 10 μ m, invece, si evidenziano due andamenti diversi: nel caso di trappole pari a 15x5 μ m per tutti i canali, la porzione di portata entrante si presenta maggiore della Qlim, indicando che altre cellule possono entrare (incapacità di isolare singola cellula). Negli altri casi (trappole 10x5 e 8x5 μ m per tutti i canali) risulta, invece, minore della soglia. La larghezza della regione di flusso corrispondente alla Qlim diminuisce al di sotto del raggio della cellula, così che nessuna cellula viene più indirizzata all'interno della camera, una volta occlusa la trappola.

Calcolo degli indici di efficienza: OT, EI e SI

Sulla base dei dati raccolti con le simulazioni e ricavati, inoltre, dal loro confronto, è stato possibile calcolare gli indici di interesse, per un'analisi completa dell'efficienza delle diverse configurazioni prese in esame (canali 25-100 μ m e trappole 8, 10 e 15 μ m). In figura 3.8 sono riportati i tre grafici relativi ai dati ottenuti per gli indici OT, EI e SI nel caso di cellule con diametro pari a 10 μ m (dato che aveva evidenziato due comportamenti diversi al variare delle trappole). Il primo grafico riguarda quindi l'occlusività (OT) della trappola, ed è ottenuto come differenza percentuale tra portata in ingresso alla camera in configurazione aperta e chiusa. Il secondo è relativo all'efficienza di intrappolamento (EI) e si ricava come differenza percentuale tra la portata in ingresso in configurazione aperta e la Qlim. L'ultimo rappresenta l'efficienza di intrappolamento (SI) di singola cellula, ed è calcolato come differenza percentuale tra la Qlim portata in ingresso in configurazione occlusa.

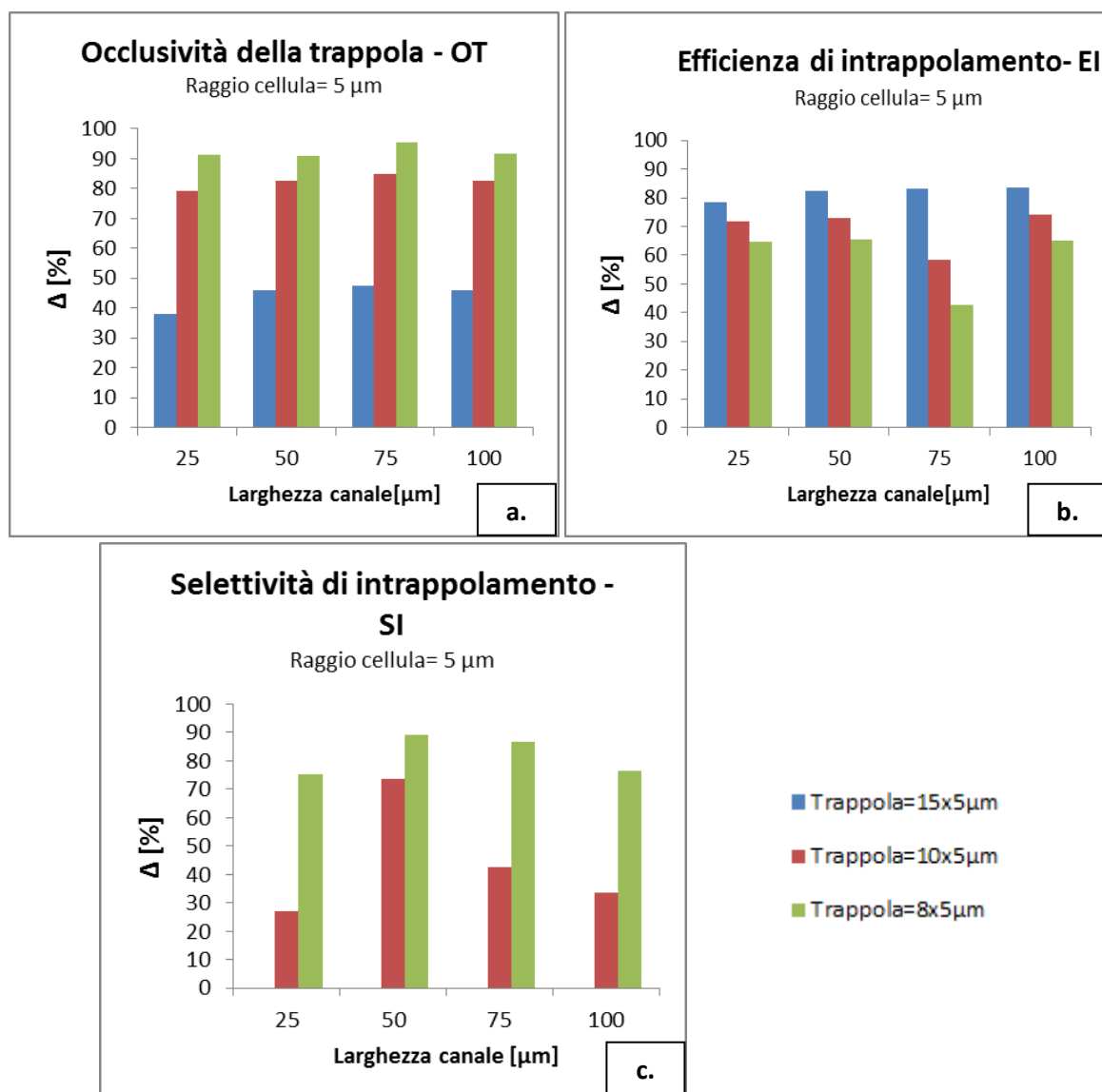


Figura 3.6- Grafici relativi all'andamento degli indici a) OT b) EI c) SI al variare della larghezza del canale e della trappola.

Per quanto riguarda l'indice OT (Figura 3.6a) i valori massimi si ottengono per trappole larghe 8 μm, mentre i valori più bassi per trappola 15x5 μm. All'aumentare delle dimensioni del canale si registrano OT più elevati, ma le differenze tra questi sono, comunque, ridotte. L'indice EI (Figura 3.6b) mostra un andamento opposto registrando valori massimi per trappola larga 15 μm e minimi per trappola 8x5 μm. Il grafico (Figura 3.6c) relativo all'indice SI non riporta i dati ottenuti con trappola larga 15 μm, dal momento che questi sono negativi, risultando tali dimensioni non in grado di garantire intrappolamento di singole cellule. Si evidenziano valori maggiori per canale largo 50 μm.

Dai risultati ottenuti sugli studi della distribuzione delle portate nei diversi casi sopra riportati, è stato possibile selezionare 7 combinazioni di canali e trappole che, tra tutte, hanno mostrato i migliori risultati in termini di efficienza di intrappolamento:

1. Canale: 50x25 μm ; Trappola: 8x5 μm
2. Canale: 50x25 μm ; Trappola: 10x5 μm
3. Canale: 50x25 μm ; Trappola: 15x5 μm
4. Canale: 75x25 μm ; Trappola: 10x5 μm
5. Canale: 75x25 μm ; Trappola: 15x5 μm
6. Canale: 100x25 μm ; Trappola: 10x5 μm
7. Canale: 100x25 μm ; Trappola: 15x5 μm

Non si realizzano versioni con canale largo 25 μm , in quanto una dimensione di tale tipo innalza la pressione a valori troppo elevati, se paragonati ai limiti cui si è fatto riferimento fino ad ora. Si realizza un'unica variante di dispositivo con trappola larga 8 μm perché, nonostante gli ottimi risultati mostrati da tale trappola con tutte le combinazioni di canale, questo valore si presenta inferiore al limite di fabbricazione eseguita tramite tecniche di soft-litografia. Dal momento che i risultati migliori con qualsiasi trappola si sono ottenuti con canale 50 μm , si è optato per associare alla trappola larga 8 tale canale. Le altre versioni, rappresentando un compromesso tra le diverse variabili in gioco, sono state quindi realizzate per verificarne, attraverso esperimenti pratici, l'effettiva funzionalità.

Perdite di carico lungo l'unità di base

Gli studi computazionali avviati per le diverse configurazioni e combinazioni dimensionali scelte hanno consentito, inoltre, di valutare la caduta di pressione nelle diverse situazioni, a conferma della fattibilità e attuabilità delle varianti selezionate. Dai risultati ottenuti è stato possibile ricavare i grafici descrittivi dell'andamento della caduta di pressione sull'unità, al variare della portata, riportati in figura 3.7, relativi alla sola configurazione aperta. I valori di portata presi in esame sono stati: 0.05 (3 $\mu\text{L/h}$), 0.2 e 2 $\mu\text{L/min}$. Tali portate sono state selezionate al fine di valutare il comportamento dei dispositivi nelle diverse situazioni cui verrà sottoposto in fase di validazione biologica. Al momento della semina, le cellule verranno caricate nel chip ad una portata dell'ordine dei $\mu\text{L/min}$ mentre, lasciato in coltura, sarà attraversato da una portata, data in ingresso al gradiente, dell'ordine dei $\mu\text{L/h}$.

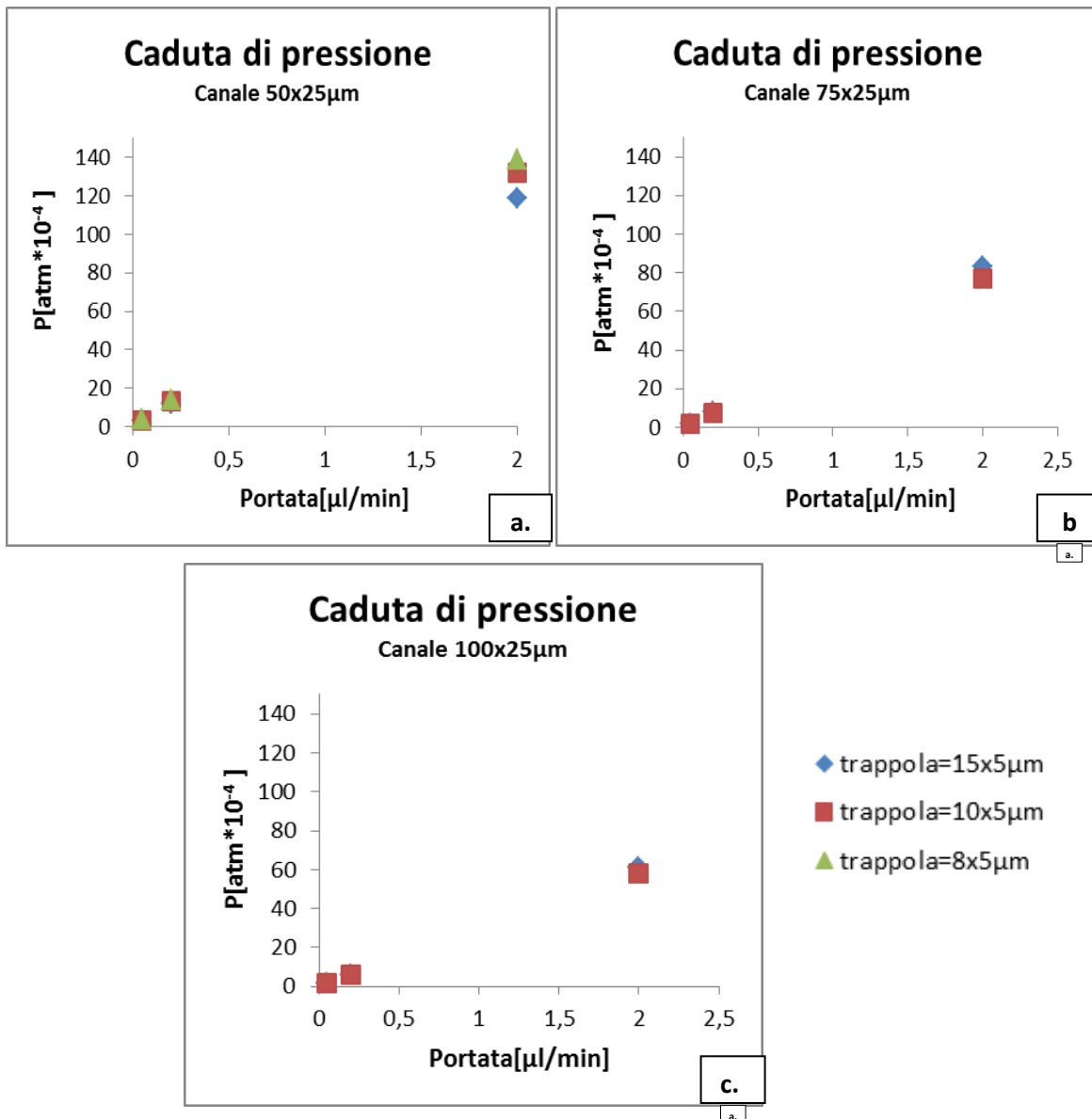


Figura 3.7- Caduta di pressione in funzione della portata data in ingresso, registrata ai capi dell'unità di base in configurazione aperta. Grafici relativi a dispositivi caratterizzati da **a)** canale largo 50µm **b)** canale largo 75µm **c)** canale largo 100µm . I risultati mostrano la caduta di pressione al variare della larghezza delle trappole (8,10 e 15µm).

Ricavando il coefficiente angolare della regressione lineare, è possibile trovare il valore della resistenza idraulica corrispondente alla combinazione canale-trappola considerata. Un confronto dei risultati ottenuti con il limite di utilizzo che ci si è posti (per cautela pressione massima pari a 5atm) han permesso di ricavare una prima stima del numero di ripetizioni di unità base realizzabili in serie all'interno di un singolo blocco delle 6 unità di intrappolamento previste da progetto.

	Trappola[μm]	
Q=0,05 $\mu\text{l}/\text{min}$	10x5	15x5
P(canale=50 μm)	3,3 [atm*10 ⁻⁴]	2,9 [atm*10 ⁻⁴]
P(canale=75 μm)	2,1 [atm*10 ⁻⁴]	1,9 [atm*10 ⁻⁴]
P(canale=100 μm)	1,5 [atm*10 ⁻⁴]	1,4 [atm*10 ⁻⁴]
	Trappola[μm]	
Q=0,2 $\mu\text{l}/\text{min}$	10x5	15x5
P(canale=50 μm)	13,2[atm*10 ⁻⁴]	11,9[atm*10 ⁻⁴]
P(canale=75 μm)	8,3[atm*10 ⁻⁴]	7,7[atm*10 ⁻⁴]
P(canale=100 μm)	6,1[atm*10 ⁻⁴]	61,2[atm*10 ⁻⁴]
	Trappola[μm]	
Q=2 $\mu\text{l}/\text{min}$	10x5	15x5
P(canale=50 μm)	132,3[atm*10 ⁻⁴]	119[atm*10 ⁻⁴]
P(canale=75 μm)	83,2[atm*10 ⁻⁴]	77,3[atm*10 ⁻⁴]
P(canale=100 μm)	5,77[atm*10 ⁻⁴]	57,8[atm*10 ⁻⁴]

Tabella 3.2- Cadute di pressione a cavallo dell'unità di intrappolamento calcolate per trappole larghe 10 e 15 μm e tutte le larghezze di canale selezionate(50,75 e 100 μm) al variare della portata imposta.

Verificato che tutte le combinazioni esaminate danno la possibilità di progettare un dispositivo costituito dalla successione di ben oltre 100 unità di base, considerando l'ingombro geometrico (Tabella 3.3), si realizzano infine 16 unità in serie, mantenendole costanti per tutte le combinazioni studiate. Tale numero di successioni consente di realizzare un numero soddisfacente di replicati per analisi statistiche. Ciascuna unità di intrappolamento risulta, infatti, costituita dalla serie di 48 camere sottoposte alla medesima condizione.

3.2 Realizzazione e caratterizzazione dimensionale del dispositivo microfluidico

Come già affermato, sono state realizzate 7 varianti del dispositivo caratterizzate da diverse larghezze di canali e trappole, per quanto riguarda le unità di intrappolamento, ma che mantengono costante, invece, il *layout* del generatore di gradiente. Di tutte le varianti del circuito selezionate, sono stati realizzati i corrispettivi disegni tramite *software* CAD. Da quest'ultimo è stato possibile ottenere il corrispondente *master* microstrutturato in silicio, e, tramite *replica molding*, diverse copie negative in PDMS. Mediante questa procedura sono state prodotte in modo seriale le piattaforme elastomeriche, utili per la

realizzazione del dispositivo, ottenuto unendo queste ultime con un vetrino da istologia, che sigilla le due interfacce (Figura 3.8).

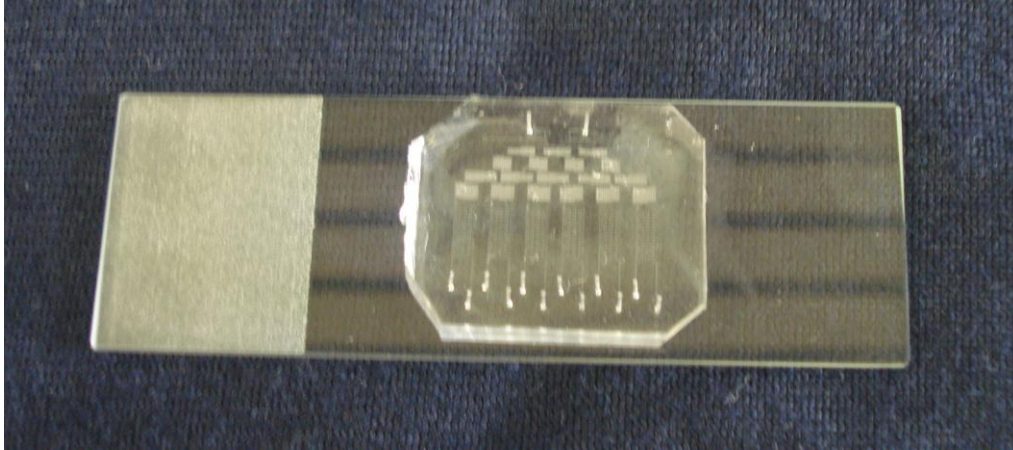


Figura 3.8- Esempio di dispositivo ultimato.

In tabella 3.3 si riportano gli ingombri totali delle due unità funzionali.

Dimensione	Valore
Ingombro direzione x	19[mm]
Ingombro direzione y: unità di intrappolamento	10[mm]
Ingombro direzione y: generatore	8[mm]

Tabella 3.3- Dimensioni dispositivo.

Le diverse versioni sono state ottenute, quindi, tramite tecniche litografiche di cui si studia la fedeltà di replica, confrontando le dimensioni (larghezze ed altezze delle *features* dell'unità base di intrappolamento e degli HB) misurate dai dispositivi così fabbricati, rispetto a quelle previste da progetto. A tal fine sono state acquisite immagini di microscopia dei dettagli di interesse (Figura 3.9, 3.10).

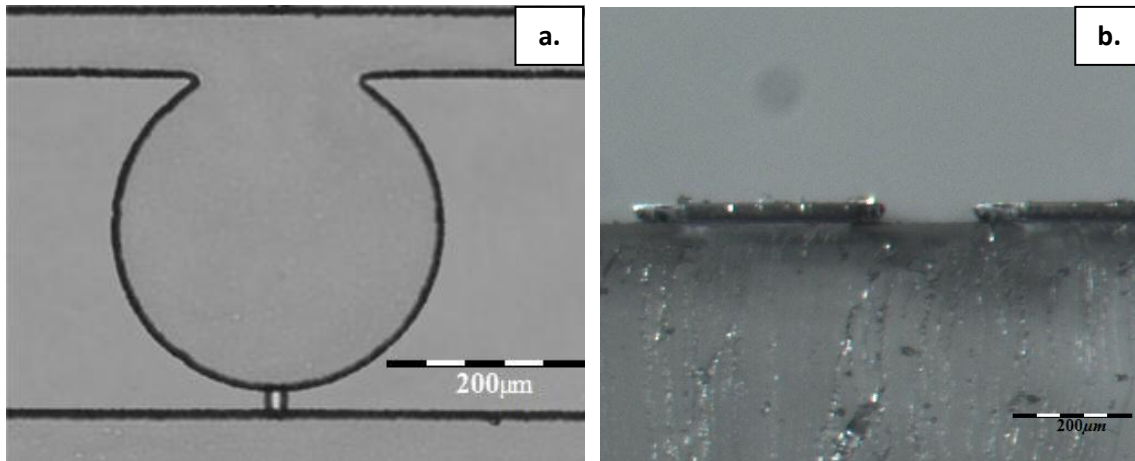


Figura 3.9- *a) Dettaglio camera con trappola (ingrandimento 8X) b) Dettaglio camera con canale in sezione (ingrandimento 4X). Immagini a stereomicroscopio.*

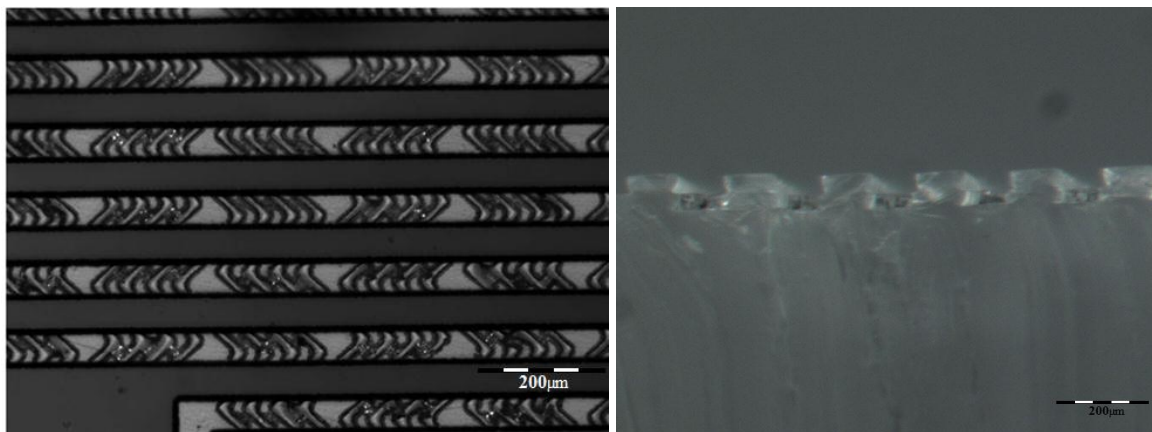


Figura 3.10- *a) Dettaglio tratto verticale con herringbones generatore di gradiente (ingrandimento 8X) b) Dettaglio tratti di mixing con herringbones in sezione (ingrandimento 6X). Immagini a stereomicroscopio.*

Tramite microscopio ottico è stato possibile catturare la larghezza e l'altezza di ogni caratteristica presente sia nell'unità base, sia nel generatore di gradiente. In figura 3.11 sono riportati i risultati ottenuti da 5 immagini, derivanti da altrettanti dispositivi, di ognuna delle quali sono state effettuate 3 misure.

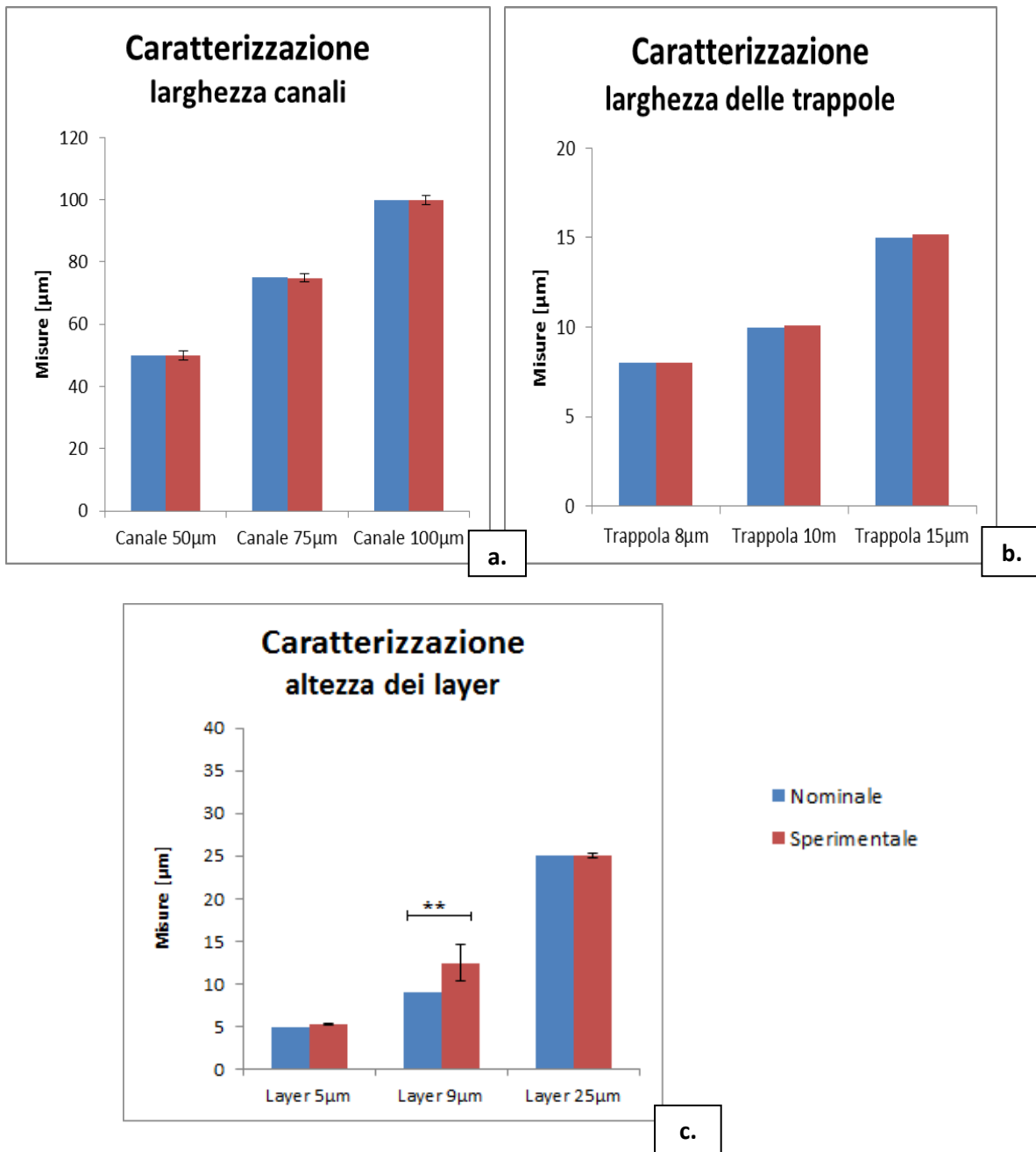


Figura 3.11- Caratterizzazione geometrica relativa ai canali principali, trappole ed herringbones dei dispositivi progettati e realizzati. Confronto tra valore sperimentale e nominale **a)** della larghezza dei canali principali (valori nominali 50,75 e 100μm) **b)** della larghezza delle trappole (valori nominali 8,5,10 μm) **c)** dell'altezza dei layer (valori nominali 5,9,25 μm). Errore statisticamente significativo (*= $p < 0,01$). Le barre di errore identificano le deviazioni standard ($n=5$).

Il grafico relativo alle larghezze dei canali (Figura 3.11a) mostrano un errore percentuale delle grandezze misurate sperimentalmente rispetto a quelle previste da progetto pari al massimo a 0,001 %. La differenza tra le due risulta quindi non statisticamente significativa.

Per quanto riguarda invece le *features* caratterizzanti il generatore di gradiente, e quindi nello specifico gli *herringbones*, sono stati evidenziati difetti, imperfezioni e contorni non ben definiti che non hanno consentito di effettuarne misure in termini di larghezza o distanza tra le scanalature stesse. Le pareti non risultano, infatti, perfettamente squadrate e, come il grafico in figura 3.11c mostra, le misure effettuate sulle sezioni evidenziano errori statisticamente significativi se confrontate con i valori previsti da progetto ($9\ \mu\text{m}$). Per errori di fabbricazione gli HB sono stati, quindi, prodotti di dimensioni notevolmente maggiori, così che il canale e gli HB nel complesso mostrano un'altezza pari a circa $40\ \mu\text{m}$.

Lo stesso grafico permette di constatare che le altre altezze rispettano, invece, il progetto (errore massimo dello 0,001%).

Per limiti di fabbricazione, com'era previsto essendo ai limiti della realizzabilità, i dispositivi caratterizzati da trappola $8 \times 5\ \mu\text{m}$ mostrano, nella maggior parte dei casi, imperfezioni e difetti. In figura 3.12, si riporta una microscopia di un dispositivo con trappola larga $8\ \mu\text{m}$, con in evidenza le trappole mancanti o deformate.

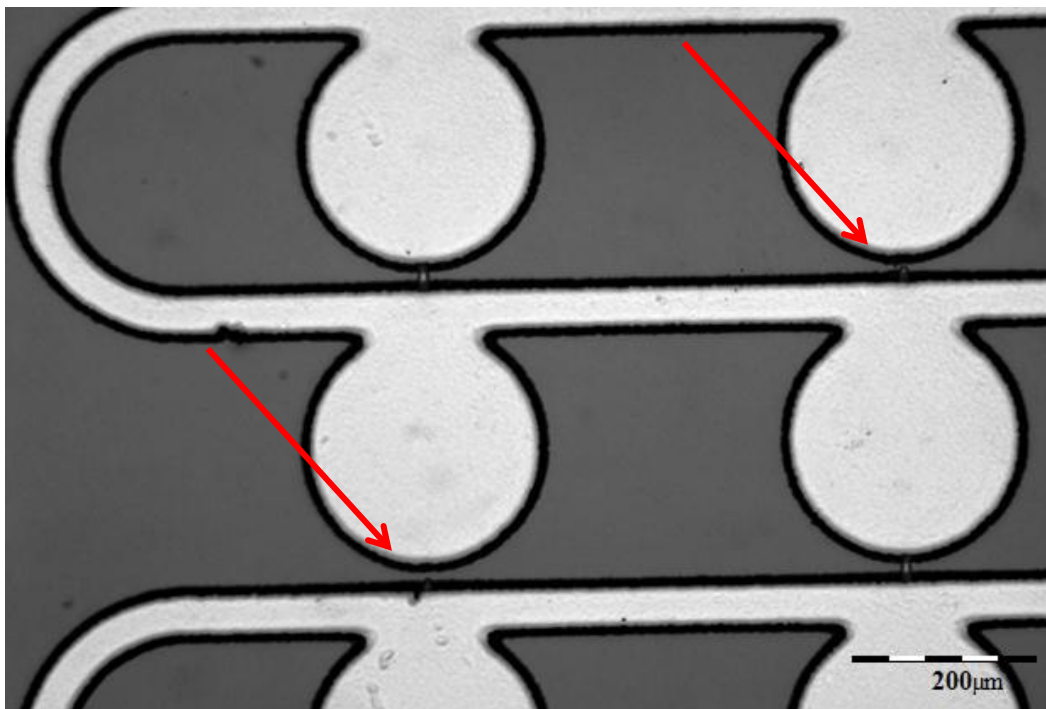


Figura 3.12- Analisi dei difetti a livello delle trappole. Immagine a stereoscopia del dispositivo con canali 50×25 e trappola $8 \times 5\ \mu\text{m}$. In evidenza i difetti legati ai limiti di fabbricazione delle dimensioni stesse. (Ingrandimento 8X).

3.3. Validazione del dispositivo microfluidico

Analizzata la fedeltà geometrica dei dispositivi realizzati, i diversi test preliminari hanno, dapprima, permesso di verificare i risultati ottenuti al calcolatore in fase di progetto e, in un secondo momento, hanno permesso di valutare l'efficienza di entrambi gli elementi funzionali che caratterizzano il chip stesso. Si sono quindi ottenuti esiti riguardanti sia la capacità di intrappolamento, sia la realizzazione di un gradiente lineare di concentrazioni di particelle. Successivamente, sono stati condotti esperimenti biologici preliminari, che hanno portato a una valutazione della vitalità di singole cellule a 3 giorni dalla semina.

3.3.1. Unità di intrappolamento: validazione fluidodinamica

Le sei unità di intrappolamento sono state progettate in modo da risultare autonome tra loro, così da poter studiare simultaneamente su un unico dispositivo, 6 condizioni diverse e indipendenti. Tale capacità è stata verificata, in modo qualitativo, tramite esperimenti che hanno permesso di seguire il percorso di una bolla, immessa nel circuito in condizioni diverse. Perché sia assicurata e rispettata l'indipendenza, in qualsiasi condizione venga immessa, la bolla deve direzionarsi verso l'unica serpentina con canale di scarto non occluso.

In tutti i test, sono state isolate 5 unità di intrappolamento, tramite l'uso di *clamp* applicate ai rispettivi tubi di ingresso e uscita. In questa configurazione sono stati studiati i casi in cui una bolla viene introdotta dal gradiente, dal canale di semina dell'unità libera con gli ingressi del gradiente occlusi e infine dal canale di semina dell'unità libera con imposta una bassa portata in ingresso dal gradiente. I diversi esperimenti sono stati inizialmente condotti con portata pari $0,2\mu\text{L}/\text{min}$, aumentata in seguito al fine di trovare, per i diversi casi, la portata limite oltre la quale l'autonomia delle 6 unità non risultasse più garantita.

Per quanto riguarda i primi due casi, in cui non vi sono flussi contrari a quello di immissione della bolla, quest'ultima scorre entro la serpentina libera, senza risalire nel generatore di gradiente o direzionarsi verso le altre unità di intrappolamento, fin tanto che la portata di perfusione si mantiene al di sotto dei $12\mu\text{L}/\text{min}$. Tale limite cresce fino a $50\mu\text{L}/\text{min}$, nel caso in cui in ingresso al generatore di gradiente viene imposta una portata

dell'ordine dei $\mu\text{L}/\text{h}$. In figura 3.13 è riportata, a titolo esemplificativo, l'immagine di una bolla che, immessa dal canale di semina, prosegue il suo percorso entro la serpentina dell'unità libera.

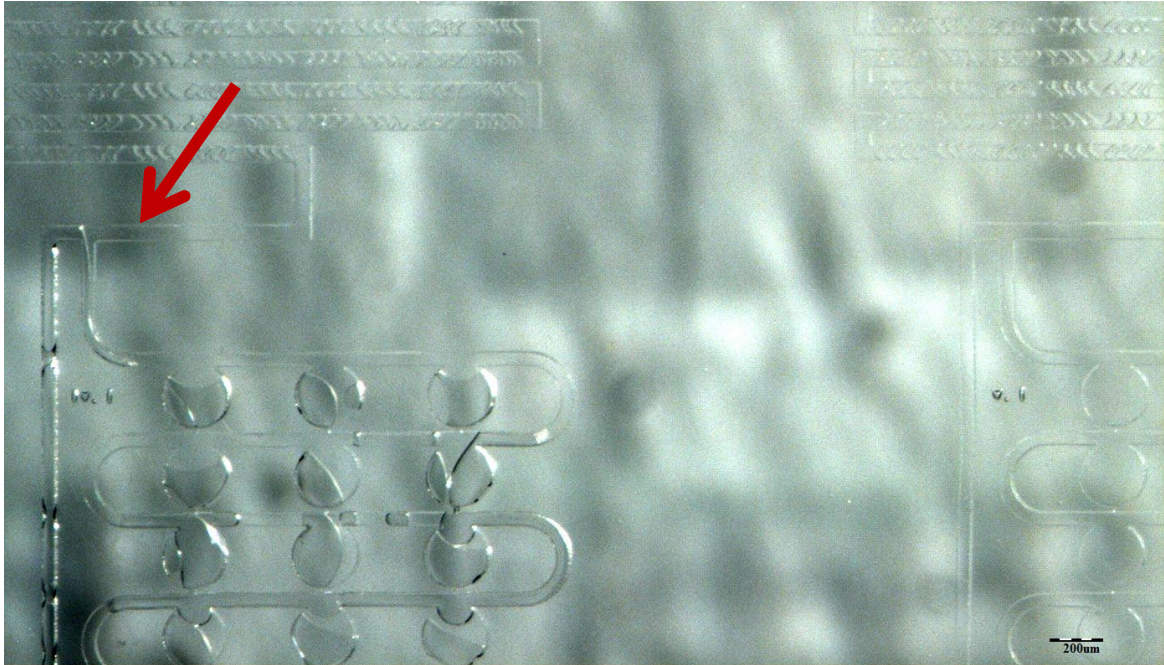


Figura 3.13- Analisi dell'indipendenza fluidodinamica delle unità di coltura. La bolla, inserita nel canale di semina dell'unità di intrappolamento a sinistra, si muove solo lungo la serpentina dell'unità stessa, come evidenziato dalla freccia rossa. Immagine a stereomicroscopio del dispositivo riempito di acqua distillata (Ingrandimento 2X)

L'autonomia delle 6 unità di intrappolamento e quindi la possibilità di testare in modo simultaneo diverse condizioni su di un medesimo chip è mantenuta per le portate d'esercizio, con buon margine di sicurezza (semina cellulare condotta a portata pari a $2\mu\text{L}/\text{min}$).

3.3.2. Unità di intrappolamento: validazione funzionale

Le prove condotte per la valutazione funzionale dell'unità di intrappolamento hanno, dapprima, permesso di verificare l'efficacia della modalità di immissione delle cellule all'interno del circuito. Grazie alle elevate cadute di pressione nelle unità, è stato possibile, infatti, utilizzare un controllo in pressione, effettuato con strumentazione semplice e economica. Gli esperimenti per tale fase di validazione sono stati, quindi, condotti tramite l'uso di uno sfigmomanometro. La valvola, di cui è dotato lo strumento, permette di

regolare con facilità e in modo controllato la pressione imposta alla sospensione, raccolta all'interno dei tubi tygon, collegati, tramite una rampa, allo sfigmomanometro stesso (vedi Materiali e metodi, paragrafo 2.3.2.). In questo modo, la sospensione si muove all'interno dei canali con una velocità, predicibile tramite la legge di Hagen-Poiseuille.

Prove con sfere in polistirene

In un secondo momento, è stato possibile testare la capacità dei chip di intrappolare una singola particella all'interno delle camere preposte. Tramite microscopio è stato inizialmente possibile monitorare l'ingresso delle sfere nel canale di semina e seguirne il percorso lungo la serpentina. A seguito del comportamento mostrato dalle stesse, il valore della pressione imposto è stato variato al fine di trovare quello che consentisse un intrappolamento efficace. L'ottimizzazione del protocollo ha portato a definire la pressione ideale da imporre alla sospensione pari a 100mmHg (corrispondenti a una portata di circa 2 μ L/min, a conferma dei dati computazionali). A una pressione minore le sfere risultavano caratterizzate da una velocità tale da impedirne l'ingresso nelle camere, le linee di flusso non deflettevano sufficientemente verso la trappola e le particelle, appena dopo il loro ingresso, uscivano dal lato opposto dell'apertura superiore della camera stessa. A pressioni maggiori più sfere entravano e permanevano all'interno di una medesima camera. Aumentando ulteriormente il valore della pressione imposto, le particelle sfuggivano dalla camera, scorrendo lungo la trappola deformandosi e continuando a percorrere la serpentina sottostante.

Oltre a selezionare la pressione di intrappolamento ottimale, tali prove hanno consentito di valutare quali combinazioni geometriche risultassero più efficaci, mostrando risultati soddisfacenti, e che si è scelto di testare anche con cellule. Solo i dispositivi con canale principale di dimensioni pari a 50x25 μ m han mostrato risultati significativi. Tale risultato era già stato evidenziato tramite simulazioni computazionali (Risultati paragrafo 3.1.1). A titolo esemplificativo si riporta, in figura 3.14, un'immagine al microscopio della geometria, caratterizzata da canali larghi 50 μ m e trappole larghe 10, in cui sono state isolate singole sfere di polistirene.

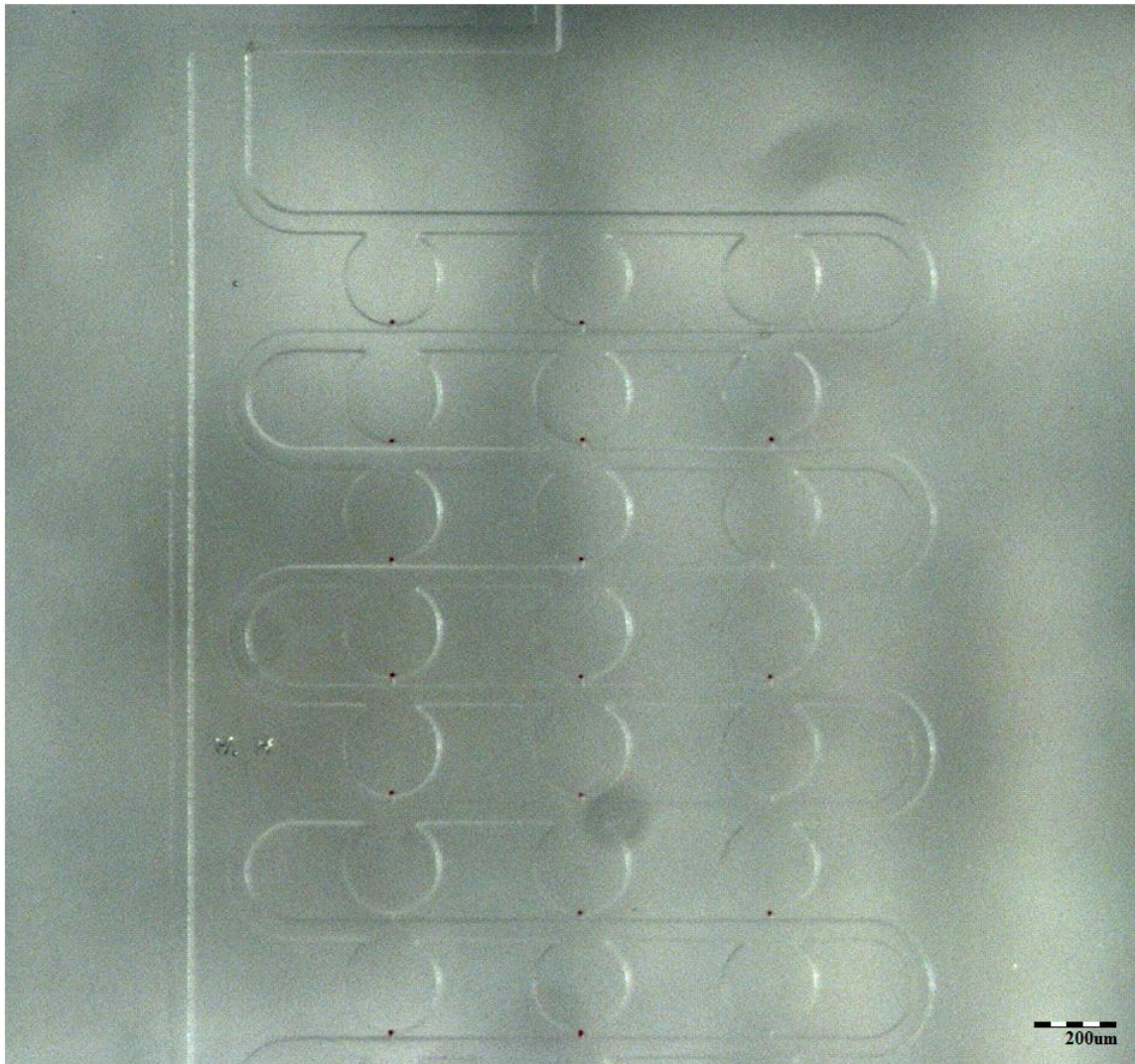


Figura 3.14- Analisi dell'intrappolamento di singola sfera. Immagine a stereomicroscopio del dispositivo con canali 50×25 e trappola $10 \times 5 \mu\text{m}$. In rosso sono visibili le sfere intrappolate nelle camere a bloccate a livello dell'ingresso della trappola (Ingrandimento $2X$).

Nonostante gli ottimi risultati computazionali, per limiti di fabbricazione sono stati esclusi i dispositivi caratterizzati da trappola $8 \times 5 \mu\text{m}$, in cui imperfezioni e difetti hanno impedito uno studio sistematico.

Prove con cellule HeLa

Successivamente, sono stati, quindi, condotti esperimenti di intrappolamento cellulare sui dispositivi precedentemente selezionati, con pressioni di semina pari a 100 mmHg e densità cellulare di $0.2 \cdot 10^6$ cell/ml. Per tale fase di validazione sono state usate cellule HeLa, con diametro medio pari a $16.6 \mu\text{m}$ (dev.st di 2.1). In figura 3.15 è riportato il *time lapse* dell'intrappolamento di una singola cellula all'interno di una camera (canale $50 \times 25 \mu\text{m}$ e

trappola $15 \times 5 \mu\text{m}$), ottenuto attraverso una ripresa con fotocamera ad alta velocità. Tale successione di immagini consente di monitorare il percorso seguito dalle cellule immesse nel canale principale. La prima cellula entra nella camera e prosegue la sua traiettoria indirizzandosi verso la trappola. Bloccata la trappola, la cellula seguente entra nella camera ma la sua traiettoria deflette, riportandosi nel canale principale.

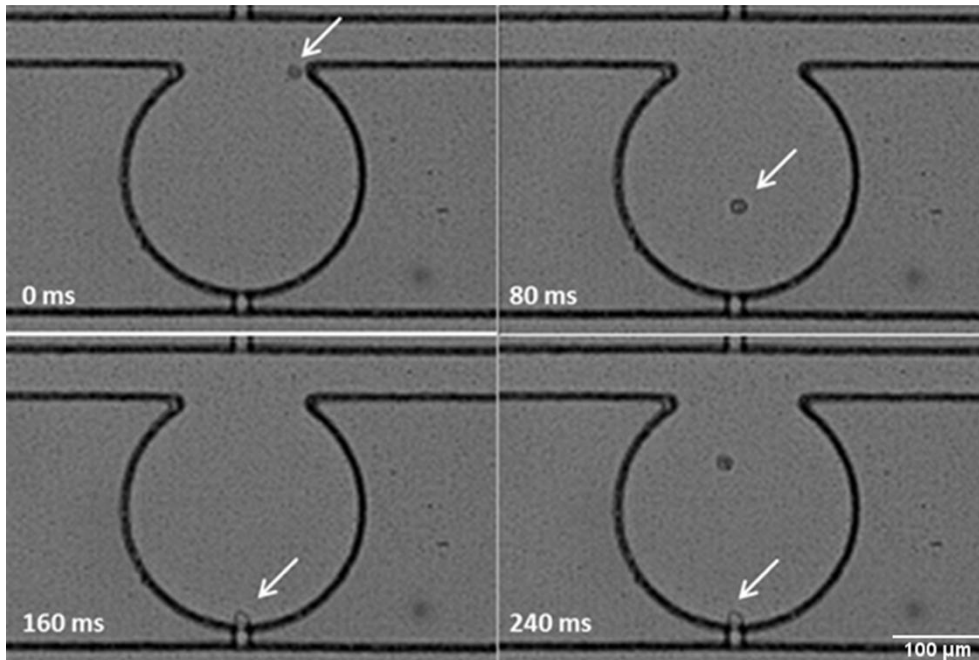


Figura 3.15- Analisi del percorso seguito dalla cellula all'interno del dispositivo a diversi time point. Immagine in contrasto di fase del dispositivo con canali 50×25 e trappola $15 \times 5 \mu\text{m}$. In evidenza il percorso della prima cellula che viene intrappolata, impedendo l'ingresso della seconda cellula (Ingrandimento 8X).

In figura 3.16 è riportato il grafico relativo all'efficienza di intrappolamento dei dispositivi selezionati, che mostra il numero medio di cellule intrappolate in una singola unità rapportato al numero totale di camere presenti nell'unità stessa e quindi al massimo numero di cellule intrappolabili. Le unità di intrappolamento che, all'interno del dispositivo, non hanno intrappolato alcuna cellula, non sono state prese in considerazione. Questa scelta è stata dettata dal fatto che tale risultato si evidenziava in presenza di difetti del dispositivo o residui all'interno dei canali, che bloccavano il passaggio della sospensione cellulare o la trappola stessa che, occlusa, non intrappolava le cellule.

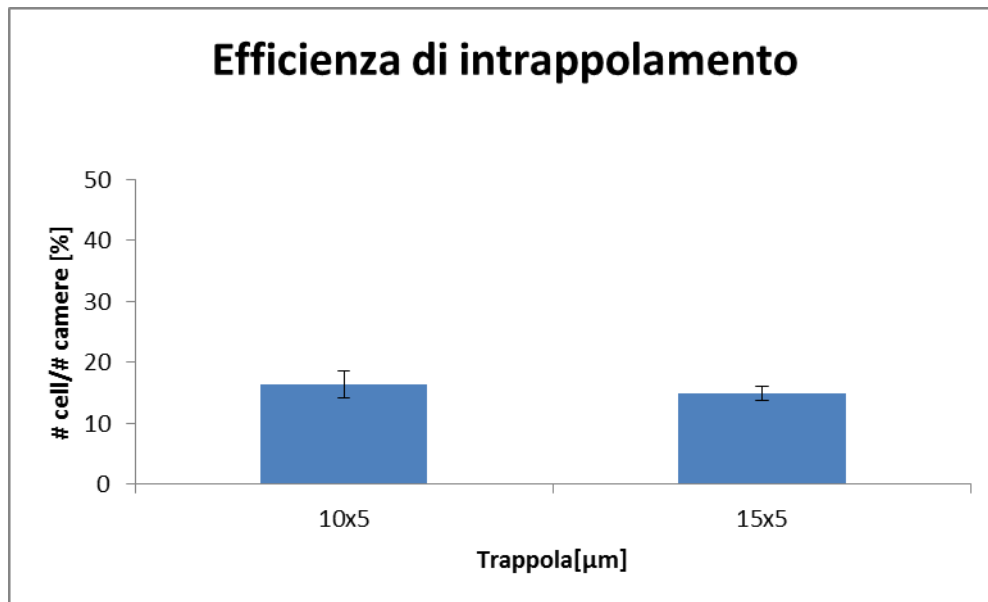


Figura 3.16- Valutazione efficienza di intrappolamento delle due geometrie in esame. Grafico relativo a dispositivi caratterizzati da trappole 10x5 e 15x5 μm . I risultati mostrano il numero medio di cellule intrappolate all'interno di un'unità di intrappolamento normalizzato per il numero di camere totali. Le barre di errore identificano le deviazioni standard ($n=5$).

Non è riscontrabile una differenza rilevante tra i dispositivi caratterizzati da trappole di diversa dimensione, questo perché sono state scelte cellule di dimensioni superiori ad entrambe (Hela con diametro medio di $16\mu\text{m}$). Tali risultati si presentano non pienamente soddisfacenti a causa della presenza di detriti che inficiano l'efficienza del dispositivo stesso.

A titolo esemplificativo, in figura 3.17, le immagini a microscopio riportano l'intrappolamento cellulare in un dispositivo con canali larghi $50\mu\text{m}$ e trappole larghe $15\mu\text{m}$ e uno caratterizzato da trappola $10x5\mu\text{m}$.

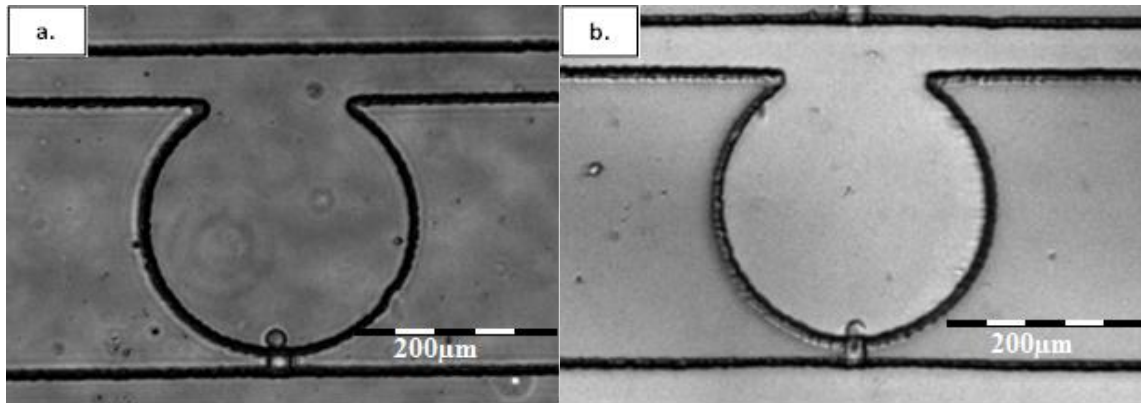


Figura 3.17- Rappresentazione cellula intrappolata. Immagine a microscopio del dispositivo con canali 50x25 e a) trappola 15x5 μ m b) trappola 10x5 μ m (Ingrandimento 8X).

3.3.3. Generatore di gradiente: validazione fluidodinamica

Le prove relative alla validazione della fluidodinamica che caratterizza il generatore di gradiente sono volte a verificare che le ripartizioni di portata all'interno dei diversi rami, calcolate in fase di progetto, risultino corrette. Occlusi i canali di semina delle unità di intrappolamento, si avvia la pompa a siringa alle portate scelte, e si controlla che quella che si ottiene in uscita dalle unità corrisponda a quella prevista. Sono stati condotti due esperimenti, uno a portata in ingresso pari 15 μ L/min e l'altro a 1.5 μ L/min, su 3 dispositivi diversi per poterne fare un calcolo statistico. Tali valori, del medesimo ordine di grandezza di quelli studiati con analisi computazionali, sono stati selezionati al fine di facilitare le relative valutazioni in questa fase di validazione. In figura 3.18, il grafico mostra la portata in uscita a ciascun ramo del gradiente normalizzata rispetto a quelle previste da progetto.

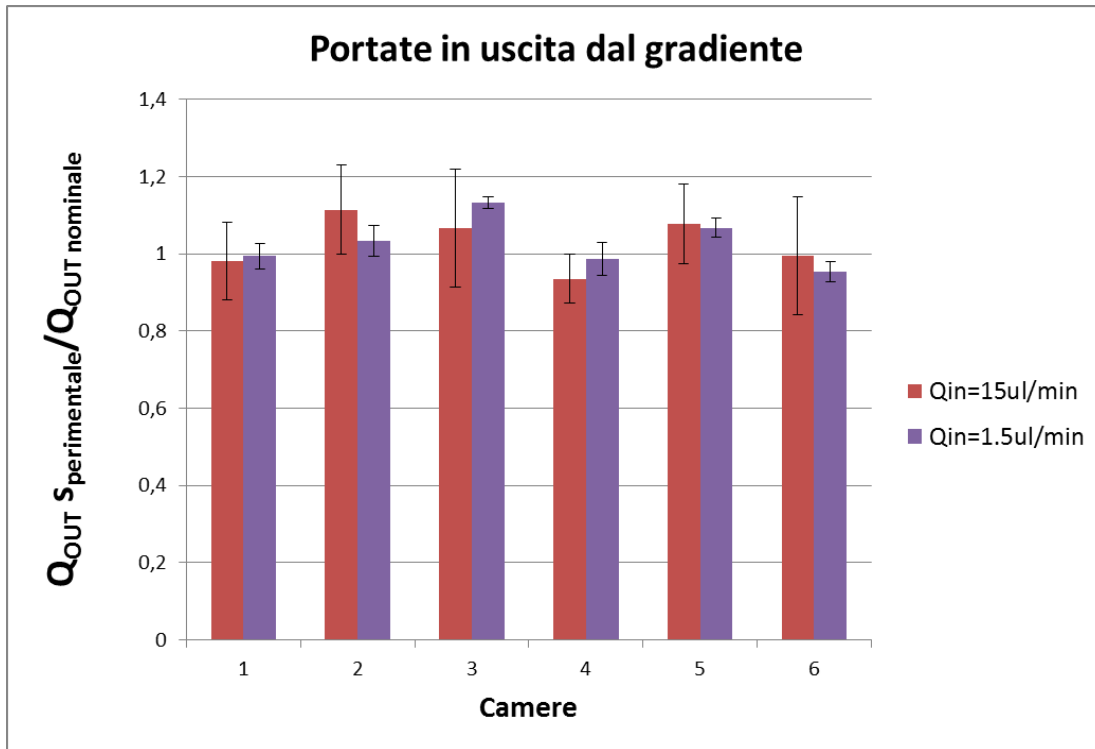


Figura 3.18- Valutazione portata in uscita da gradiente. Grafico relativo a dispositivi caratterizzati da portata in ingresso al generatore pari a 1.5 e 15 µL/min. I risultati mostrano la portata in uscita dalle singole unità di intrappolamento normalizzate rispetto a quella prevista da progetto. Le barre di errore identificano le deviazioni standard (n=5).

Non si evidenziano differenze statisticamente significative tra il valore di controllo previsto da progetto e quello ottenuto sperimentalmente e nemmeno tra le diverse uscite, come evidenziato da analisi condotte attraverso il test statistico One way ANOVA seguito dal test post-hoc di Bonferroni utilizzando il *software* GraphPad.

3.3.4. Generatore di gradiente: validazione funzionale

Dapprima, la funzionalità del generatore di gradiente è stata valutata in termini di capacità di creare un *mixing* di sostanze con alto coefficiente di diffusione e di dare in uscita 6 diluizioni lineari delle stesse.

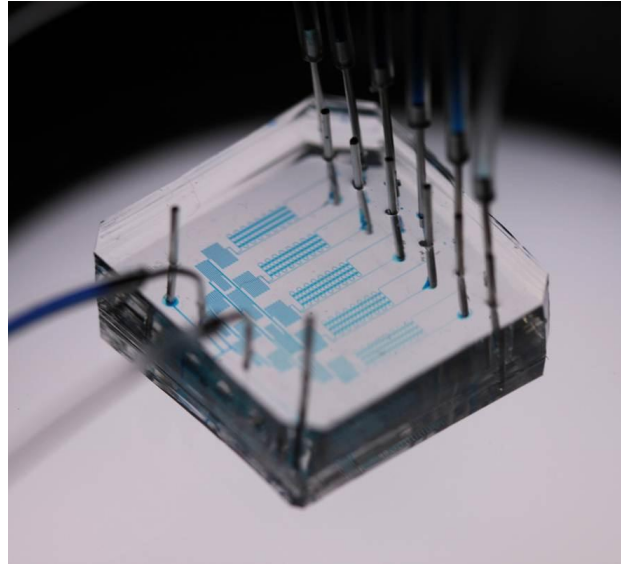


Figura 3.19- Ripartizione del flusso all'interno del network costituente il generatore di gradiente. Immagine del dispositivo attraversato da due fluidi e conseguente generazione di gradiente di concentrazione lungo il circuito stesso.

A tal fine sono stati iniettati nei due ingressi del generatore colorante alimentare blu (a destra) e acqua distillata (sinistra) a una portata dell'ordine dei $\mu\text{L}/\text{min}$. In figura 3.20 si riporta l'immagine a microscopio del dispositivo attraversato dai due fluidi.

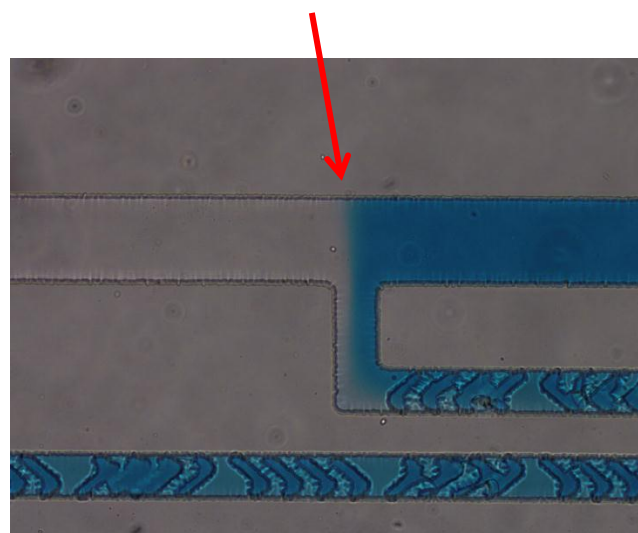
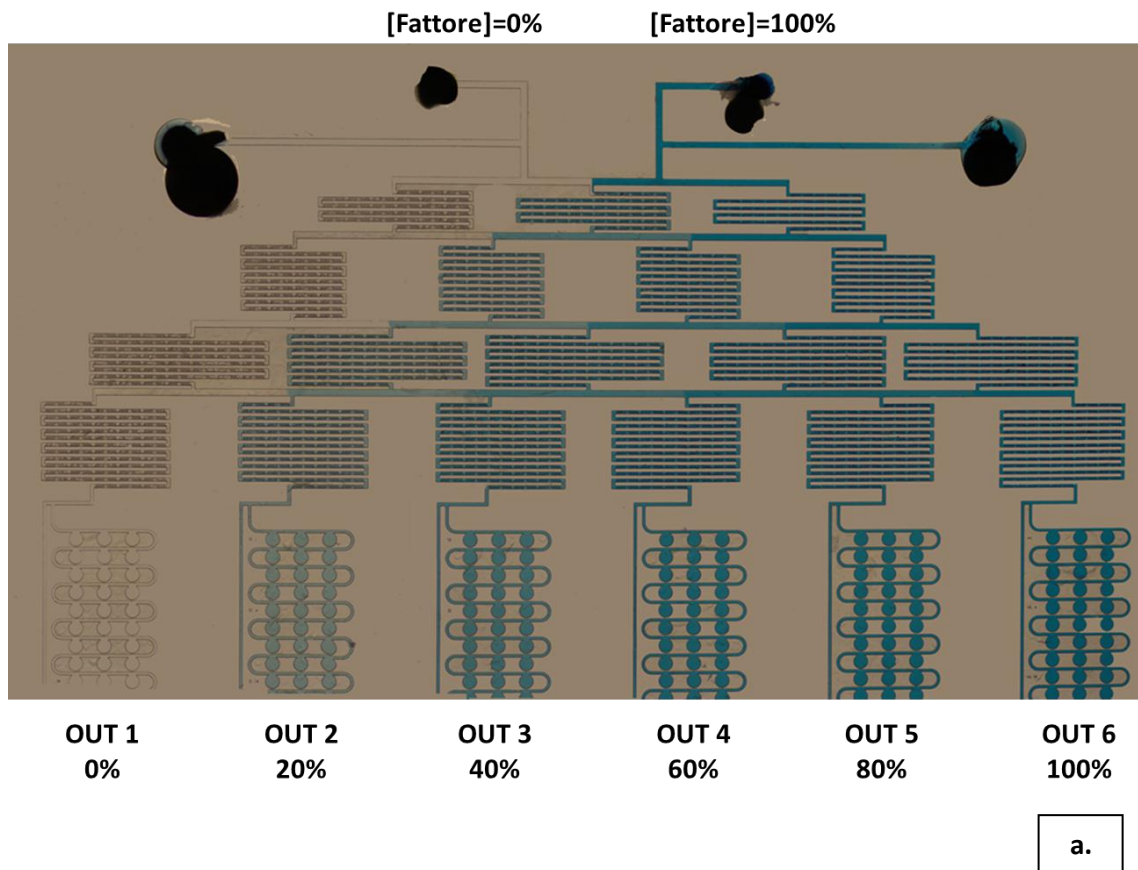


Figura 3.20- Ripartizione del flusso all'interno del network costituente il generatore di gradiente.
a) Ricostruzione da immagini a stereomicroscopio del dispositivo attraversato da due fluidi. A sinistra è stata immessa acqua distillata, a destra colorante blu. Si evidenzia mixing e generazione di gradiente di concentrazione dei due fluidi. Riportati i valori di concentrazione in ingresso e uscita. (Ingrandimento 0.8X)
b) Dettaglio di un tratto orizzontale, costituente il generatore di gradiente, che sfocia in un ramo verticale, dove avviene il mixing di acqua e colorante. La freccia indica la separazione dei due fluidi, che è mantenuta fin tanto che non si ha l'ingresso dei due nelle successioni delle unità HB. (Ingrandimento 8X)

L'avvenuta generazione di un gradiente di concentrazione può essere apprezzata semplicemente a livello visivo. Da sinistra verso destra, le unità di intrappolamento risultano attraversate da una sempre maggior quantità di colorante (Figura 3.20a). Per aver certezza della linearità è necessaria però un'analisi quantitativa, che permetta di stabilire le diverse concentrazioni che si hanno in uscita dal generatore.

A tal fine, si conducono i medesimi esperimenti con due diversi coloranti alimentari: il blu e il giallo. Per ogni volume raccolto si effettuano 3 misure di assorbimento luminoso in funzione della lunghezza d'onda del blu (570nm), tramite spettrofotometro, su 3 dispositivi diversi e le si confronta con campioni di controllo, ottenuti manualmente miscelando le giuste proporzioni dei due coloranti. In figura 3.21, il grafico mostra l'andamento dell'assorbimento, normalizzato rispetto a quello nominale, alle diverse uscite.

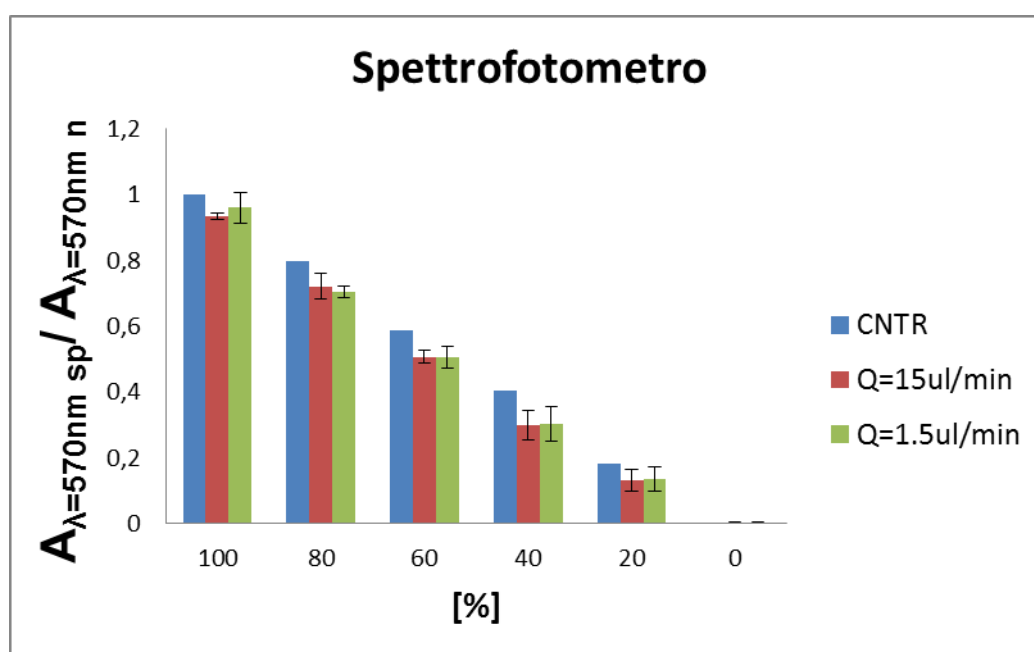


Figura 3.21- Valutazione misure di assorbimento luminoso effettuate tramite spettrofotometro. Grafico relativo a dispositivi caratterizzati da portata in ingresso al generatore pari a 1.5 e 15 $\mu\text{L}/\text{min}$. I risultati mostrano l'assorbimento sperimentale normalizzato rispetto a quello nominale delle diverse uscite.

Si osserva un andamento lineare nella diminuzione dell'assorbanza del blu (e quindi della sua concentrazione) passando dall'uscita cui dovrebbe corrispondere una concentrazione di blu massima (100%), verso quella opposta. I valori ricavati sperimentalmente risultano confrontabili con quelli ottenuti manualmente, miscelando i due coloranti nelle opportune

proporzioni. Non ci sono differenza statisticamente significative, come evidenziato da t test eseguito con GraphPad.

In un secondo momento, è stata valutata l'effettiva capacità di creare un *mixing* di particelle di dimensioni consistenti (condrociti nasali di diametro medio di 12 μ m). Grazie alla proteina fluorescente verde aggiunta alle cellule è possibile visualizzarle tramite microscopio a fluorescenza e avanzare un'analisi qualitativa sulla realizzazione del gradiente lineare (Figura 3.22).

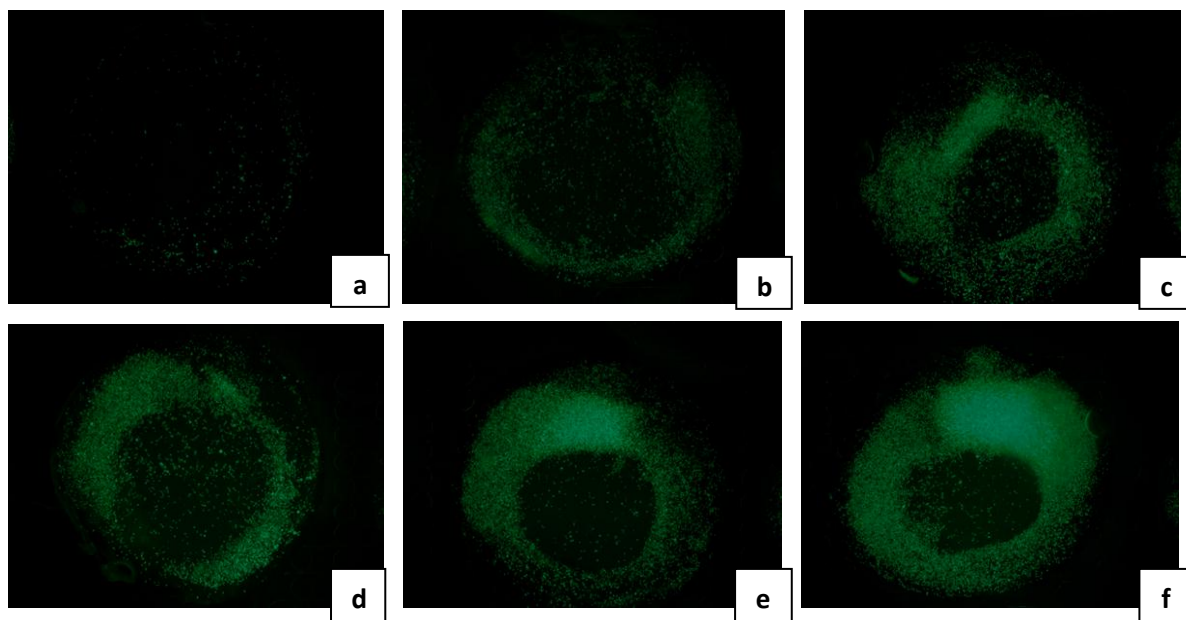


Figura 3.22- Analisi generazione di gradiente lineare. Microscopie a fluorescenza dei pozzetti creati in uscita al gradiente. Pozzetti corrispondenti a concentrazione di **a)** 0% **b)** 20% **c)** 40% **d)** 60% **e)** 80% **f)** 100%. (Ingrandimento 4X).

Con il progredire delle immagini risulta maggiormente apprezzabile la presenza di cellule evidenziate tramite GFP. Si nota quindi un aumento del numero di cellule dall'immagine in figura 3.22a verso quella in figura 3.22f. La prima rappresenta il pozzetto in uscita al generatore in corrispondenza dell'ingresso di PBS (0%), l'ultima quella in corrispondenza della sospensione cellulare (100%).

Sono in corso prove sperimentali per analizzare quantitativamente la formazione di tale gradiente lineare.

3.4. Validazione biologica preliminare: coltura cellulare

Le prove di coltura cellulare preliminari sono finalizzate alla verifica della citocompatibilità del dispositivo microfluidico. Colture di singole cellule intrappolate all'interno di chip caratterizzati da canali di dimensioni $50 \times 25 \mu\text{m}$ e trappole pari a $10 \times 5 \mu\text{m}$ sono state monitorate per 2 giorni. Per questi esperimenti è stata utilizzata una concentrazione di semina pari a $0,2 \cdot 10^6 \text{ cell/ml}$ e una pressione di intrappolamento di 100 mmHg . Una volta intrappolate le cellule, è stata imposta una portata di perfusione costante in coltura pari a $30 \mu\text{L/h}$ (che assicura una portata verso ciascuna unità di intrappolamento pari a $10 \mu\text{L/h}$, che si ripartisce con un rapporto 10:1 tra camere di coltura e canale secondario), per permettere un continuo ricambio del mezzo di coltura, mantenendo allo stesso tempo bassi sforzi di taglio [44].

A seguito dei risultati ottenuti alla macroscale, sono state condotte prove di coltura condotte con cellule U87, dimensionalmente compatibili con il dispositivo e comparabili alle altre cellule in termini di vitalità in condizioni di isolamento. Seguendo le medesime modalità di semina presentate nei Materiali e metodi (paragrafo 2.3), il comportamento e l'adesione cellulare di questa linea cellulare sono state monitorate dopo 4 (Figura 3.23a), 24 (Figura 3.23b), 48 (Figura 3.23c) ore.

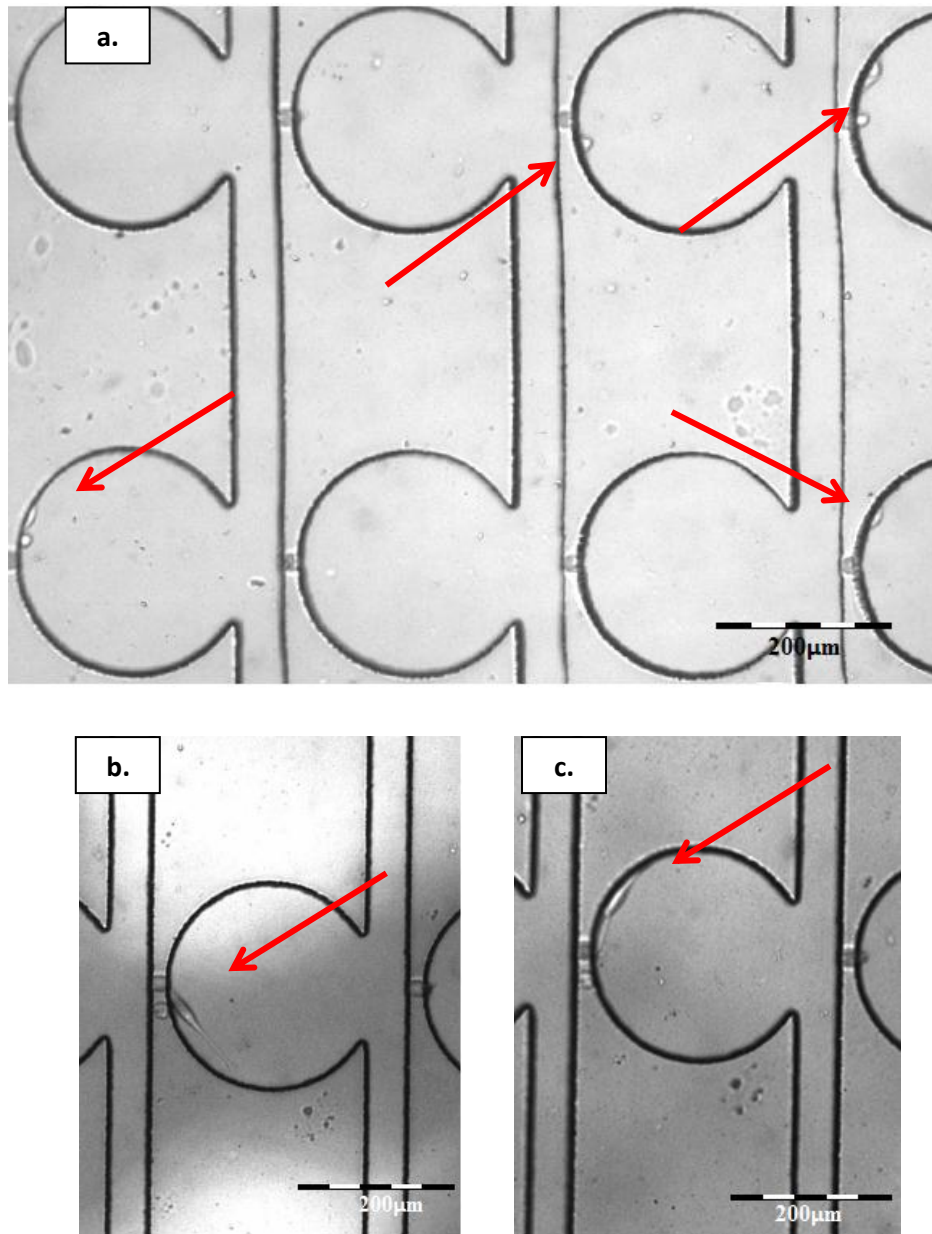


Figura 3.23- Analisi coltura cellulare. Immagini prese a microscopio dopo **a) 4h b) 24h c) 48h** dalla semina . Dispositivo con canali 50×25 e trappole $10 \times 5 \mu\text{m}$. Si segue il comportamento di una cellula intrappolata e lasciata in coltura per più giorni (Ingrandimento $8X$).

Dopo 4 ore dalla semina (Figura 3.23a), più camere risultano occupate da singole cellule che si presentano di forma allungata indicando vitalità cellulare e avvenuta adesione al substrato. Nelle successive immagini si riporta il comportamento di una cellula nei giorni seguenti a quello della semina. Dopo 24 ore (Figura 3.23b) la cellula mantiene la morfologia allungata e caratterizzata da protrusioni, presentandosi dopo 48 ore (Figura 3.23c) in fase di migrazione come indicato da una posizione diversa rispetto al giorno precedente. Il dispositivo risulta quindi compatibile con coltura di singola cellula fino a 48

ore dall'intrappolamento. Un monitoraggio a più giorni permetterà di verificare la compatibilità della piattaforma per colture cellulari prolungate e finalizzate a trasfezione genica.

4.DISCUSSIONE

Il *gene delivery*, tecnica che prevede l'inserzione di nuovo materiale genetico all'interno di una cellula ospite, è diventato un prezioso strumento sperimentale per lo studio della funzione dei geni e della loro regolazione, oltre che per l'esplorazione di potenziali applicazioni terapeutiche nei confronti di varie malattie acquisite o ereditate. L'iniezione di molecole di DNA nudo, però, non risulta un approccio efficace, a causa della repulsione elettrostatica con la membrana cellulare, che ne impedisce l'internalizzazione [1, 2]. Pertanto, la sfida primaria per la terapia genica risulta essere lo sviluppo di metodi che facilitino il trasferimento genico ad una mirata cellula, senza causare la degradazione del gene espresso.

La possibilità di somministrazione ripetuta e di trasporto di materiale genetico di dimensioni idealmente illimitate sono le caratteristiche principali dei vettori non virali, molecole sintetiche o naturali, in grado di complessare gli acidi nucleici [7, 8, 28, 29]. L'utilizzo di vettori non virali sfrutta l'interazione tra gli acidi nucleici, carichi negativamente, e molecole cariche positivamente, come polimeri o lipidi, le quali, schermandoli, consentono agli acidi nucleici stessi di entrare in contatto con le componenti della membrana e quindi di poter essere incorporati nella cellula mediante endocitosi. I complessi prendono il nome di poliplessi quando generati da polimeri, di lipoplessi quando i vettori appartengono alla famiglia dei lipidi. La sfida principale per un'efficace applicazione *in vivo* di tali vettori non virali risulta quella volta all'ottenimento di elevato potere di trasfezione, mantenendo il sistema biocompatibile e immunocompatibile. A tale scopo risulta promettente la possibilità di modificare la struttura e i gruppi funzionali dei polimeri, perché vengano aumentate l'efficienza di consegna e la loro biocompatibilità, migliorate le proprietà chimico-fisiche dei complessi e la capacità di rilascio del materiale genetico, perché venga correttamente introdotto nel nucleo della cellula [9].

In questo contesto, la crescita in campo microfluidico crea nuove prospettive per la terapia genica e il *gene delivery*, offrendo uno strumento indirizzato all'automatizzazione delle operazioni, alla valutazione simultanea di diverse condizioni, alla diminuzione dei tempi di analisi e all'incremento dell'efficienza dei risultati [33]. Il ricorso a canali di dimensioni micrometriche permette di aumentare il controllo spazio-temporale delle cellule target e del materiale genetico esogeno, consentendo di raggiungere maggiore precisione, più alta

efficienza di trasfezione e vitalità cellulare. Inoltre, i sistemi microfluidici offrono la possibilità di condurre analisi di singola cellula che hanno la potenzialità di portare a risultati deterministici non più basati sull'andamento stocastico, tipico di popolazioni cellulari eterogenee. È possibile quindi applicare tali principi agli studi di ottimizzazione di vettori non virali per terapia genica [10, 11]. Nella prospettiva di comparare diverse configurazioni di vettori non virali per ottenere un disegno ottimo in termini di efficienza e compatibilità, l'utilizzo di piattaforme per singola cellula combinate a tecnologie di *high throughput* permettono di semplificare e velocizzare le diverse operazioni, oltre che di ottenere risposte precise di tipo on/off per la stima dell'avvenuta trasfezione cellulare.

La prima criticità in questa direzione è rappresentata dallo sviluppo di un metodo riproducibile, che consenta il posizionamento delle singole cellule in una precisa locazione per permetterne l'analisi [40]. I diversi approcci presenti in letteratura sfruttano trappole ottiche, magnetiche, dielettroforetiche o meccaniche [14]. Tali meccanismi, grazie ai bassi numeri di Re che caratterizzano i flussi ad una scala submillimetrica e alle proprietà elastomeriche del materiale con cui i dispositivi sono realizzati (PDMS), hanno dimostrato capacità di isolare una singola cellula dalla popolazione eterogenea immessa nel chip stesso. Un diverso approccio è rappresentato da dispositivi che, sfruttando la variazione di resistenza idraulica che si ottiene a seguito dell'intrappolamento stesso, permettono di ottenere l'isolamento di singole cellule all'interno di camere di coltura di dimensioni adeguate [46, 52]. Questi principi sono stati implementati nel dispositivo progettato da Hong et al. [15], a cui il presente lavoro si ispira, caratterizzato da un'unità base costituita da 3 camere di coltura di forma circolare collegate, tramite due accessi, ad un canale principale. La connessione superiore consente l'ingresso delle cellule e il ricambio diffusivo del mezzo di coltura, quella inferiore, invece, è costituita da un breve condotto, di dimensioni inferiori al resto del circuito, costituisce una trappola per la cattura di singola cellula. Si evidenzia inoltre la presenza di un generatore di gradiente chimico che permette analisi multiple su un medesimo chip.

Considerato il fine ultimo del dispositivo progettato nel presente studio, ovvero l'isolamento di singole cellule per studi di trasfezione genica tramite vettori non virali, il disegno del chip è caratterizzato dalla presenza di camere di coltura di dimensioni adeguate all'interno delle quali, sfruttando la variazione di resistenza passiva, si riesca a intrappolare e coltivare singole cellule. Inoltre, per poter svolgere studi di trasfezione genica condotti a diverse concentrazioni di vettori, il dispositivo è stato modificato per poter esser

parallelamente in grado di creare un gradiente di fattori non solubili, indirizzabili in maniera indipendente verso le unità di coltura.

L'individuazione delle configurazioni ottimali è stata ottenuta tramite il ricorso a studi computazionali condotti con *software Comsol Multiphysics*, eseguiti sulle geometrie di base che caratterizzano il dispositivo. Tali operazioni hanno permesso di dimensionare in modo adeguato il circuito nel suo insieme, potendo definire le geometrie potenzialmente funzionanti da realizzare. Selezionate queste ultime, tramite tecniche foto e soft litografiche, i dispositivi più promettenti sono stati prodotti in serie, in modo da potervi svolgere esperimenti per una validazione di tipo fluidodinamico e funzionale. Queste operazioni hanno poi consentito di individuare la configurazione ottimale da sottoporre a prove di coltura preliminari, per ulteriore *screening* sulla vitalità cellulare e biocompatibilità del chip stesso. Queste basi permetteranno l'utilizzo e l'ottimizzazione del dispositivo progettato e validato, in vista di studi di trasfezione genica.

Nel progettare il dispositivo microfluidico, che permette l'intrappolamento e la successiva coltura di singole cellule, si sono fissate a priori le dimensioni delle altezze di canali e trappole mentre si sono mantenute variabili quelle delle larghezze. Questa scelta è stata dettata dalla tecnica di fabbricazione utilizzata (*soft lithography*). Per scegliere i valori dimensionali delle restanti grandezze sono state, invece, condotte analisi computazionali agli elementi finiti.

La scelta della combinazione di canale principale e trappola ottimale si basa sulla necessità di bilanciare la differenza di resistenze esistenti tra i due, in modo da ottenere in ingresso alla camera una portata in ingresso massima se la camera è vuota (configurazione aperta) e portata minima quando c'è una cellula ad occludere la trappola (configurazione occlusa). In base a questo, si sono eseguite simulazioni computazionali per ottenere una combinazione di larghezze di canali (principali e trappola) che fornissero resistenze idrauliche adeguate. Perché sia assicurato l'isolamento di singole cellule, infatti, una certa quantità di flusso deve essere garantita nella camera quando questa si trova in configurazione aperta, mentre, passando a quella occlusa, la portata deve idealmente azzerarsi. Questo perché la cellula, occludendo la trappola, innalza la resistenza della camera impedendo l'ingresso di ulteriori cellule, indirizzandole a valle. Diverse analisi numeriche sono state, quindi, condotte per valutare l'influenza di ogni parametro sulla distribuzione della portata all'interno del dispositivo. Come è evidente nei grafici riportati

nei Risultati (paragrafo 3.1.1. Figure da 3.3 a 3.5), si nota che diminuendo la portata in ingresso alle camere ed aumentando la larghezza del canale e della trappola si ottiene una maggiore percentuale di portata entrante nelle camere e una conseguente diminuzione di quella che le bypassa. Si evidenzia inoltre una riduzione della quota parte in ingresso alla camera quando questa risulta occlusa. Comportamento analogo si ha all'aumentare delle dimensioni delle cellule intrappolate.

I risultati ottenuti hanno reso evidente la necessità di definire un parametro che permettesse di individuare le combinazioni migliori, in grado di consentire l'ingresso di almeno una cellula in configurazione aperta. A tale scopo è stata ricavata la portata minima che si deve garantire alla camera perché si abbia l'ingresso di almeno una cellula, in modo da ottenere una soglia teorica (Q_{lim}) che permettesse di distinguere in modo immediato il caso di possibile intrappolamento, dalle condizioni che non lo consentivano. Sopra questa soglia, infatti, può esserci intrappolamento e al di sotto la camera viene, invece, bypassata. Questo perché la Q_{lim} rappresenta la porzione di portata corrispondente al filetto di fluido in cui è immerso il centro della cellula e che, quindi, la cellula stessa segue nel suo percorso all'interno del canale. La Q_{lim} viene quindi ricavata come porzione di portata corrispondente ad una sezione di canale di larghezza pari al raggio di una cellula (distanza minima che una cellula può avere dalla parete e quindi larghezza minima della *streamlines* perché contenga il centro della cellula stessa), questa aumenta al crescere delle dimensioni della cellula stessa e diminuisce all'aumentare della larghezza del canale. Si è quindi confrontata la soglia Q_{lim} con la distribuzione della portata in ingresso ad una camere per le diverse combinazioni di canale e trappola.

Dal paragone delle due, si osserva che le portate in ingresso alle camere in configurazione aperta, per tutte le combinazioni di canali e trappole, risultano maggiori di entrambe le soglie (calcolate per cellula con diametro 10 e 16 μm). Ciò significa che, nel momento in cui la trappola è libera, tutte le combinazioni dovrebbero teoricamente assicurare l'ingresso di almeno una cellula. Al contrario, per configurazione occlusa con sfera di 16 μm di diametro, la portata risulta sempre minore di entrambe le linee orizzontali riportate nei grafici. Tale risultato implica che, quando una cellula di raggio 8 μm è stata intrappolata, qualsiasi combinazione di canale-trappola garantisce che nessun'altra cellula entri in quella camera. Lo studio della configurazione occlusa con sfera di diametro 10 μm risulta invece più discriminatorio, mostrando due andamenti diversi nel caso di trappole di diametro maggiore e minore rispetto alla sfera considerata. Infatti, la portata all'interno di dispositivi

con trappola larga $15\mu\text{m}$ supera la soglia calcolata per sfere di raggio $5\mu\text{m}$, mentre risulta inferiore alla medesima Qlim in chip con trappole di larghezza 10 e $8\mu\text{m}$. Questo perché, fin tanto che la trappola presenta dimensioni maggiori della sfera che la chiude, l'occlusione non è totale ma vi è passaggio di trafiletti di fluido attraverso la trappola stessa, per cui la resistenza risulta minore al caso di completa ostruzione, permettendo l'ingresso di una quantità di portata maggiore. Ciò implica che, nel caso di dispositivo caratterizzato da trappola larga $15\mu\text{m}$, quando in ingresso al canale principale è imposta una sospensione di cellule con diametro pari a $10\mu\text{m}$, nel momento in cui una cellula è stata intrappolata, non è sicuro che nessun'altra cellula entri all'interno di quella camera. Nel caso invece in cui tale sospensione sia immessa in dispositivi caratterizzati da trappola 10 o $8\mu\text{m}$, una volta che una cellula è stata intrappolata, le altre teoricamente proseguono oltre, verso camere libere.

Da queste prime considerazioni è stato possibile stabilire quali fossero gli indici necessari per una valutazione più accurata, che portasse a trovare le combinazioni soddisfacenti per le applicazioni previste. A tal riguardo OT, EI e SI sono stati definiti affinché occlusività, efficienza di intrappolamento e efficienza di indirizzamento di singola cellula fossero analizzate per tutte le combinazioni prese in esame. Per quanto riguarda il primo indice si calcola la differenza tra le portate ottenute da simulazioni condotte in configurazione aperta e quelle in configurazione occlusa normalizzandola per il primo parametro citato. Questo consente di avanzare considerazioni sull'efficienza della trappola di isolare una singola cellula e costituire un blocco per le successive. Idealmente, nel momento in cui la cellula occlude la trappola, la portata in ingresso a quella camera dovrebbe tendere a zero, assicurando in questo modo che nessun'altra cellula vi possa entrare; in realtà, il flusso deve comunque mantenersi seppur esiguo, senza annullarsi, in quanto in fase di coltura cellulare deve essere assicurato l'ingresso del mezzo di coltura, necessario per mantenere in vita le cellule stesse. In questi termini, tale differenza deve quindi presentarsi elevata, perché a fronte di una determinata portata che consente l'ingresso di una cellula, ne deve seguire una, molto inferiore, nel momento in cui la trappola è bloccata. L'indice EI viene, invece, calcolato come differenza percentuale tra la portata ricavata da simulazioni svolte su dispositivi in configurazione aperta e la Qlim per il rispettivo caso. Definendo l'efficienza della combinazione canale-trappola di indirizzare cellule verso le camere aperte, anche tale differenza deve essere massima perché i risultati siano ottimi. Un esito di tale tipo infatti assicurerebbe che la portata in ingresso alle camere in configurazione

aperta sia maggiore della Qlim, garantendo l'ingresso di almeno una cellula. L'ultimo indice dà la possibilità di valutare l'efficienza della combinazione canale-trappola di bypassare le camere piene, assicurando la cattura di singole cellule ed è calcolato come differenza percentuale tra la Qlim e la portata in ingresso in configurazione occlusa. Anzitutto, serve che tale differenza sia maggiore di zero: in questo modo la portata minima, perché entri una cellula, risulta maggiore della portata in ingresso alla camera nel momento in cui questa è occlusa. Massimizzare poi tale indice implica assicurare che, una volta intrappolata una cellula, questa non venga raggiunta da altre che continuerebbero il loro percorso lungo la serpentina verso camere libere.

Dall'analisi dei grafici relativi agli indici stessi (Figura 3.6) è stato possibile trovare le combinazioni canale-trappola in grado di dare risultati soddisfacenti e tra queste individuare, a livello teorico, la soluzione migliore. Il valore di OT cresce al diminuire della larghezza della trappola, risultando quindi massimo per dispositivi caratterizzati da trappola $8 \times 5 \mu\text{m}$. Tali dimensioni fanno sì che una cellula di diametro 10 occluda completamente e perfettamente la trappola stessa, impedendo trafile di fluido al suo interno. Nel momento in cui la camera è bloccata, la resistenza che si genera al suo interno è quindi tale da ridurre notevolmente il flusso al suo interno (circa il 90%), assicurando che le altre cellule bypassino la camera stessa. Tali considerazioni possono essere avanzate anche per la trappola $10 \times 5 \mu\text{m}$, anche se il flusso, a seguito dell'intrappolamento, si riduce di una percentuale minore (80% circa), in quanto le dimensioni della trappola risultano confrontabili con quelli della cellula che la blocca. Valori decisamente inferiori si registrano, invece, per trappola larga $15 \mu\text{m}$. Diverso è l'andamento dell'indice EI, che decresce al diminuire delle dimensioni della trappola, mantenendosi pressoché simile per i diversi canali. Questo risultato è legato al fatto che la porzione di portata in ingresso alla camera diminuisce con la trappola, mentre la Qlim non varia con le dimensioni di quest'ultima. Rimanendo quindi costante per un medesimo canale, aumentando la larghezza della trappola si ha un aumento del valore della differenza in questione. Tale indice si presenta, quindi migliore, per trappole pari a $15 \times 5 \mu\text{m}$, che convogliano all'interno della camera una maggiore quota parte di portata imposta. L'indice SI risulta negativo per trappole larghe $15 \mu\text{m}$ ed è caratterizzato da valori crescenti passando da trappole 10×5 a trappole $8 \times 5 \mu\text{m}$. Il fatto che tale indice presenti valori inferiori allo zero implica che la portata in ingresso alle camere occluse risulti superiore della Qlim: nel caso delle trappole di dimensioni maggiori, quindi, si potrebbe avere ingresso di altre cellule anche quando la

camera risulta caratterizzata da una trappola occlusa. Per dimensioni $15 \times 5 \mu\text{m}$ non è quindi garantito un intrappolamento singolo. Analizzando la trappola $10 \times 5 \mu\text{m}$ si riscontrano, per tutti i canali, valori comunque inferiori al 50%, fatta esclusione per il canale largo $50 \mu\text{m}$, in corrispondenza del quale mostra un valore maggiore e confrontabile con quello raggiunto con trappole larghe $8 \mu\text{m}$. Tali combinazioni, evitando trafile, assicurano un intrappolamento di singola cellula.

La necessità di indirizzare linee di flusso all'interno delle camere, per permettere l'ingresso delle cellule stesse, e l'obbligo di mantenere la resistenza totale del dispositivo all'interno di valori accettabili, porta ad individuare 6 combinazioni di canale ($50, 75$ e $100 \mu\text{m}$) e trappola (10 e $15 \mu\text{m}$), cui si aggiunge il circuito con canali 50×25 e trappole $8 \times 5 \mu\text{m}$, come quelle ipoteticamente funzionanti. Non si sono realizzate versioni caratterizzate da canale largo $25 \mu\text{m}$, in quanto una dimensione di tale tipo innalza la pressione a valori troppo elevati, se paragonati ai limiti cui si è fatto riferimento fino ad ora. Si è provato a fabbricare un'unica variante di dispositivo caratterizzato da trappola larga $8 \mu\text{m}$. Questo perché, nonostante gli ottimi risultati mostrati da tale trappola con tutte le combinazioni di canale, tale dimensione si presenta inferiore al limite imposto dalle direttive relative alla fabbricazione tramite soft-litografia. Dal momento che i risultati migliori con qualsiasi trappola si sono ottenuti con canale $50 \mu\text{m}$, si è optato per associare alla trappola larga 8 tale canale. Le altre versioni, rappresentando un compromesso tra le diverse variabili in gioco, sono state quindi realizzate per verificarne, attraverso esperimenti pratici, l'effettiva funzionalità. Una validazione fluidodinamica e funzionale hanno permesso infatti di confermare i risultati ottenuti con analisi computazionali.

Le trappole larghe $8 \mu\text{m}$, pur efficienti in linea teorica, per limiti di fabbricazione già citati, a seguito delle prime prove di validazione sono state definitivamente scartate e non sottoposte a esperimenti cellulari, in quanto caratterizzate da troppi difetti, che ne inficiavano i risultati. Dalle prove di intrappolamento, prima con sfere e poi con cellule, è stato possibile selezionare due dispositivi, a conferma dei risultati CFD precedentemente ottenuti, su cui condurre prove cellulari. Per tali combinazioni, con canale $50 \times 25 \mu\text{m}$ e trappola larga 10 e $15 \mu\text{m}$, è stato messo a punto un protocollo di semina, che prevede un controllo in pressione. Gli esperimenti hanno evidenziato che per valori troppo bassi di pressione, sfere e cellule risultano caratterizzate da una velocità tale da non permetterne l'ingresso nelle camere. Ciò significa che l'inerzia di cui sono dotate le cellule non riesce a vincere le resistenze date dalla geometria della camera e della trappola. A pressioni

maggiori, però, si rischia di ottenere l'intrappolamento di più cellule. Questo perché la porzione di portata in ingresso alla camera, se aumentata troppo, diventa tale da coinvolgere più di una particella, superando la Q_{lim} teorica di un valore troppo elevato. Inoltre, aumentando ulteriormente tali pressioni, le cellule intrappolate sfuggono, passando attraverso la trappola, avendo dimensioni paragonabili alla trappola stessa e potendosi inoltre deformare. In seguito a diverse prove e alla luce di tali considerazioni, la pressione ottimale per la semina cellulare è stata stimata pari a 100mmHg.

Il numero di cellule catturate rapportato a quello delle camere disponibili ottenuto da esperimenti pratici, non risulta ottimale in quanto si colloca al di sotto del 50% portando a efficienze comunque basse. Tale risultato è legato però alla presenza di residui presenti all'interno dei canali e non a limiti funzionali del dispositivo. Durante le prove si è notato come quasi tutte le trappole catturassero qualcosa, svolgendo comunque il loro compito. Impurità, residui, polvere e sporcizia hanno inficiato i risultati venendo intrappolate all'interno delle camere, annullando la proprietà delle trappole di isolare cellule trovandosi, in questo modo, in configurazione occlusa. Vi sono, infatti, unità che han mostrato un'efficienza del 80%. Viste le piccole dimensioni che caratterizzano il dispositivo e dal momento che il funzionamento dello stesso è basato sulla variazione di resistenze in gioco, tali problemi risultano rilevanti. È tutt'ora in fase di validazione, per tale ragione, un metodo di pulizia che assicuri una riduzione di tali impurità. A seguito di queste prove, inoltre, è emerso come le trappole da $15\mu\text{m}$ risultino meno adatte a cellule di dimensioni variabili e più sensibili alle variazioni di pressione. Cellule di dimensioni ridotte, non bloccando completamente la trappola, non impediscono l'ingresso di ulteriori cellule non permettendo di ottenere un isolamento singolo. Inoltre, cellule già intrappolate, a seguito di un piccolo aumento di pressione, riescono a liberarsi deformandosi e passando attraverso la trappola. Per tale ragione anche questi dispositivi sono stati scartati.

In generale si è visto come, dati i limiti di fabbricazione delle trappole con tecniche standard (e quindi più economiche) di fotolitografia, il dispositivo funziona in modo più efficiente per cellule con diametro medio di circa $15\mu\text{m}$. Per poter raggiungere risultati soddisfacenti anche con cellule di dimensioni inferiori è necessario ridurre la larghezza della trappola, come nel lavoro di Hong et al. [15], i cui dispositivi risultano caratterizzati da trappole larghe $3\mu\text{m}$ permettendo l'isolamento di cellule di diametro $10\mu\text{m}$. Ottenere dimensioni così ridotte però non è semplice dal punto di vista costruttivo e richiede sofisticati e costosi processi di fabbricazione. Le operazioni eseguite su wafer di silicio per

raggiungere tali dimensioni sono per altro difficilmente ripetibili perché altamente variabili.

Inoltre, ciò che emerge dalle diverse prove sperimentali è come il dispositivo caratterizzato da trappole 10x5um e canale 50um presenti un'ottima potenzialità di intrappolamento cellulare, confermando i risultati computazionali, permettendo di ottenere risultati di intrappolamento in tempi ridotti e in modo automatizzato. Come mostra la figura 3.15 (Risultati paragrafo 3.3.2.), l'intrappolamento di una singola cellula all'interno di una camera è ottenibile, infatti, in pochi ms. Anche i tempi di semina sono ridotti (circa 5min) soprattutto perché, grazie all'utilizzo di una rampa a 6 accessi, è possibile caricare la sospensione cellulare in tutte e 6 le unità in parallelo, in modo sincrono. In questo modo si è in grado di ottenere in modo immediato i risultati relativi alle diverse situazioni cui si sottopongono le cellule.

All'elemento funzionale di intrappolamento si affianca, infatti, il generatore, che mira a creare un gradiente di molecole perché possano essere valutate in contemporanea sei condizioni di trasfezione diverse. Il generatore deve essere in grado di diluire una soluzione iniziale di un fattore di trasfezione, con diametro oltre i limiti di diffusione, in 6 partizioni lineari, individualmente indirizzabili alle 6 unità di coltura. Si rende, quindi, necessario un partitore lineare caratterizzato da elementi che consentano un *mixing* di tipo caotico, in modo da poter creare un generatore di gradiente di particelle non diffusive, non soggette alle equazioni del moto browniano. Tale elemento è stato progettato integrando un generatore di gradiente lineare classico in grado di dividere e riunire iterativamente i fluidi in modo da ottenere in uscita 6 diluizioni lineari della soluzione imposta in ingresso [16] con un metodo di mixing alla microscala di semplice fabbricazione in grado di indurre un mescolamento caotico tale da garantire una ridistribuzione omogenea di particelle date in ingresso [17].

Tramite un equivalente elettrico del *network* è stato possibile valutare la partizione della portata all'interno dei rami e tutti i parametri di interesse per la progettazione di tale elemento, mentre, per valutare il funzionamento del *mixer*, analisi computazionali sono state svolte sulla geometria del SHM stesso. I risultati ottenuti mostrano come le scanalature che caratterizzano tali elementi inducano un flusso radiale, risultante in due vortici contro rotanti lungo la lunghezza del canale. Il moto non avviene più con scorrimento di strati infinitesimi gli uni sugli altri senza alcun tipo di rimescolamento, in

quanto tali microstrutture generano movimenti rotazionali e caotici. In questo modo, l'area d'interfaccia aumenta e lo spessore su cui si verifica la diffusione diminuisce. Queste condizioni accelerano, quindi, il trasferimento di massa, consentendo il raggiungimento dell'omogeneizzazione dei fluidi in ingresso in tempi minori.

Ulteriori analisi hanno permesso di verificare l'effettiva efficienza di questi elementi, in termini di *mixing* raggiungibile. Grafici colorimetrici (figura 2.12) permettono di constatare come dopo 10 successioni di unità HB, il colore risulti unico ed uniforme. Partendo da due soluzioni a concentrazioni diverse, cui corrispondono due colori ben distinti, si arriva ad ottenere, grazie a queste strutture, un *mixing* omogeneo tra le due, cui corrisponde un colore intermedio. Tale situazione non è però raggiungibile senza le microstrutture degli *herringbones*. Infatti, studiando la geometria priva di scanalature si nota come solo la zona centrale risulti caratterizzata da un colore intermedio tra i due in ingresso, segno di un avvenuto mescolamento, mentre alle estremità ancora sono distinguibili i due colori iniziali. Anche l'andamento della concentrazione all'interno del canale all'inizio di ogni unità base mostra come, all'avanzare dei due fluidi lungo le unità sequenziali, le curve si appiattiscono in presenza degli *herringbones* mentre risultano sfasate, anche dopo 10 unità, nella geometria priva di scanalature; indice di raggiunta omogeneità di redistribuzione nel primo caso, e mancata verifica di tale situazione nel secondo. Per capire quante successioni sequenziali di unità HB si possono realizzare nei diversi rami, per ottenere risultati soddisfacenti alle varie portate cui si trova il dispositivo in fase di validazione cellulare, si valutano anche le pressioni che queste generano. Dal momento che il *mixing* ottenuto con gli *herringbones* risulta migliore per portate maggiori, ciò che emerge da tali studi è che all'aumentare dei livelli del generatore, e quindi della porzione di portata che scorre all'interno dei rami, si deve aumentare il numero di successioni di unità HB per assicurare un mescolamento omogeneo.

Dimensionati e uniti i due elementi, questi sono stati addizionati alle unità di intrappolamento, poste a valle. I dispositivi così ottenuti sono stati prodotti, evidenziando però, in seguito a fabbricazione, difetti soprattutto a livello del generatore di gradiente. Le pareti non risultano infatti perfettamente squadrate e le misure effettuate sulle sezioni, mostrano errori significativi per quanto riguarda le altezze dei *layer* realizzati. Tali discostamenti rispetto al disegno previsto da progetto non risultano aver avuto però influenza negativa sulla funzionalità del generatore, come mostrano gli esperimenti condotti per la valutazione del *mixing*. Infatti, studi di microscopia a fluorescenza permettono

di verificare in modo qualitativo l'ottenimento di un gradiente di particelle di dimensioni consistenti, quali i condrociti nasali (diametro 10 μ m). Questo assicura che per i poliiplessi, di dimensioni inferiori (diametro compreso tra 100 e 500nm), sia assicurato un *mixing* uniforme e lineare.

Verificate entrambe le unità funzionali, sia dal punto di vista fluidodinamico che in relazione alla loro capacità di svolgere il compito per il quale sono stati progettati, sono stati eseguiti esperimenti biologici preliminari per una valutazione della vitalità di singole cellule U87 coltivate all'interno del dispositivo, e per la verifica della citocompatibilità dello stesso. Tali esperimenti sono stati svolti su dispositivi caratterizzati da canali 50x25 e trappole 10x5 μ m che, come precedentemente affermato, risultano i più efficienti e funzionali. Seminate ed intrappolate le cellule all'interno del chip, queste vengono lasciate in coltura per 2 giorni all'interno di un incubatore che permette di ricreare le condizioni presenti all'interno dell'organismo vivente, ovvero quelle ideali per il mantenimento delle funzioni vitali delle cellule (controllo della temperatura, del grado di umidità e del livello di CO₂). Sempre per mantenere in vita le cellule, durante tale periodo, queste sono sottoposte a una portata di perfusione costante pari a 30 μ L/h, per permettere un continuo ricambio del mezzo di coltura. La forma delle cellule risulta strettamente collegata al comportamento delle stesse: presenza di protusioni che si allargano e si appiattiscono permettono crescita, espressione genica e differenziamento; cellule sferiche favoriscono fenomeni apoptotici.

Le cellule mostrano vitalità fino a 2 giorni dalla semina. Il loro aspetto si modifica, assumendo forma allungata e appiattita, indice di adesione. Ciò dà conferma della citocompatibilità del dispositivo. Un monitoraggio a più giorni permetterà di verificare la compatibilità della piattaforma per colture cellulari prolungate e finalizzate a trasfezione genica.

Si è quindi realizzato un dispositivo in grado di intrappolare singole cellule all'interno di camere, dove è possibile mantenerle in coltura per 2 giorni, potendo, inoltre, creare diverse diluizioni di vettori non virali da indirizzare verso le cellule stesse per studi di trasfezione genica. In prima analisi emerge la necessità di ottimizzare la fase di produzione, legata soprattutto alla stesura di un protocollo di pulizia che riduca al minimo i residui, evitando che questi inficino i risultati. Ulteriori prove sperimentali devono inoltre poter condurre a migliorie nelle fasi di semina e intrappolamento, stilando un protocollo che si presenti

ottimale per tutte le linee cellulari di interesse. Anche il protocollo di coltura cellulare dovrebbe subire modifiche, in funzione delle cellule usate, per poter aumentare la percentuale di vitalità delle stesse.

5. CONCLUSIONI

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di progettare, realizzare e validare un dispositivo microfluidico che permettesse l'intrappolamento e la successiva coltura di singole cellule, per studi di trasfezione genica tramite vettori non virali. Tale piattaforma dovrà, quindi, consentire l'ottimizzazione di tecniche di trasfezione non virale attraverso una valutazione *high-throughput* dell'efficienza. Per tale ragione si è ricercato un disegno, realizzabile tramite tecniche microfluidiche economiche, in grado di intrappolare e coltivare singole cellule e di condizionarle tramite gradienti automatici di vettori non virali. La miniaturizzazione delle grandezze in gioco garantisce un miglior controllo spazio temporale dei processi, grazie ad una più veloce risposta del sistema, automazione delle operazioni e uso di campioni significativamente più piccoli di quelli standard. A tali vantaggi si aggiungono quelli derivanti dallo studio di singola cellula, il quale permette una valutazione di tipo deterministico, che non risente più della eterogeneità della popolazione.

Per raggiungere l'obiettivo è stato progettato un circuito costituito da due elementi funzionali. Il primo è costituito da 6 unità di intrappolamento, indipendenti tra loro che, sfruttando una resistenza idraulica variabile in modo automatico nel momento della realizzazione dell'intrappolamento stesso, permettono l'isolamento di molteplici singole cellule all'interno di camere entro cui sono coltivate. Il secondo elemento è costituito da un generatore di gradiente di concentrazioni lineari, che permette di miscelare particelle di dimensioni elevate, quali potrebbero essere i vettori non virali. Lo studio agli elementi finiti eseguito su entrambe ha permesso di dimensionare il circuito in base alle applicazioni previste. Disegnato e prodotto tramite tecniche foto e soft litografiche, sono stati condotti diversi test preliminari, che hanno permesso di verificare la tenuta, la funzionalità e l'efficienza dei dispositivi fabbricati portando alla scelta della combinazione geometrica con risultati migliori. Steso un primo protocollo di semina si è passati a una validazione di tipo biologico per verificare la compatibilità del dispositivo stesso.

I diversi esperimenti pratici hanno permesso di confermare quanto studiato tramite analisi computazionali e testare, inoltre, le interazioni del dispositivo con le cellule. Ciò che emerge è che tale chip presenta una buona efficienza di intrappolamento di singola cellula quando l'unità risulta priva di residui e imperfezioni. Il dispositivo è citocompatibile e

consente la coltura cellulare per 2 giorni. Tramite l'uso del generatore di gradiente è possibile ottenere 6 diluizioni lineari di particelle di dimensioni importanti. In questo modo, si pone come interessante alternativa alle tradizionali e convenzionali tecniche di laboratorio per trasfezione genica, consentendo tra le altre cose vantaggi in termini di costi e tempi di fabbricazione.

Per questa ragione si è ora propensi verso lo sviluppo di ulteriori migliorie apportabili a tale sistema. Gli sviluppi futuri, nell'ottica di aumentare l'efficienza di intrappolamento dei dispositivi stessi, si dovranno concentrare quindi sulla risoluzione dei problemi riscontrati in fase di collaudo. Il primo accorgimento riguarda la pulizia dei dispositivi. È necessario trovare un procedimento veloce ma soprattutto efficace che permetta di eliminare tutte le impurità presenti, in modo che queste non incidano sull'efficienza di intrappolamento del chip stesso. La possibilità di realizzare i dispositivi in camere bianche apposite o di svolgere la maggior parte delle operazioni di produzione sotto cappa potrebbero ridurre la presenza di residui e polvere. Protocolli di semina e coltura specifici per ogni tipo cellulare potrebbero ulteriormente migliorare i risultati di intrappolamento e vitalità ottenuti. La valutazione della pressione ottimale da esercitare, al variare del diametro cellulare, perché queste vengano intrappolate all'interno delle camere senza sfuggire entro la trappola o dall'apertura superiore stessa, potrebbe innalzare il numero di cellule intrappolate in una medesima unità. Per quanto riguarda la vitalità cellulare, un primo aspetto da analizzare sarà l'ottimizzazione del protocollo di *coating*, in quanto questo influenza l'adesione e la vitalità cellulare. Si potrebbe vagliare, per ogni linea cellulare, quello più adeguato. In questo senso si dovrebbe effettuare anche una valutazione in termini di eventuali trattamenti cui sottoporre il dispositivo, per migliorarne le proprietà di adesione e di idrofilicità.

Una volta ottimizzato, il dispositivo microfluidico progettato nel presente lavoro di tesi sarà utilizzato per prove di trasfezione genica, atte a valutare l'effettivo indirizzamento dei vettori verso le cellule target, l'efficienza di trasfezione e la possibilità di monitoraggio dei risultati.

BIBLIOGRAFIA

1. Pezzoli, D., et al., *We still have a long way to go to effectively deliver genes!* J Appl Biomater Funct Mater, 2012. **10**(2): p. 82-91.
2. Niidome, T. and L. Huang, *Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors*. Gene Ther, 2002. **9**(24): p. 1647-52.
3. Mintzer, M.A. and E.E. Simanek, *Nonviral vectors for gene delivery*. Chem Rev, 2009. **109**(2): p. 259-302.
4. Mehier-Humbert, S. and R.H. Guy, *Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(5): p. 733-53.
5. Robbins, P.D. and S.C. Ghivizzani, *Viral Vectors for Gene Therapy*. Pharmacology & Therapeutics, 1998. **80**(1): p. 35-47.
6. Lundstrom, K., *Latest development in viral vectors for gene therapy*. Trends Biotechnol, 2003. **21**(3): p. 117-22.
7. Candiani, G., et al., *Bioreducible liposomes for gene delivery: from the formulation to the mechanism of action*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13430.
8. Zhang, S., et al., *Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery*. J Control Release, 2004. **100**(2): p. 165-80.
9. Al-Dosari, M.S. and X. Gao, *Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress*. AAPS J, 2009. **11**(4): p. 671-81.
10. Kim, J., et al., *Microfluidic approaches for gene delivery and gene therapy*. Lab Chip, 2011. **11**(23): p. 3941-8.
11. Migita, S., et al., *Transfection efficiency for size-separated cells synchronized in cell cycle by microfluidic device*. Biomed Microdevices, 2011. **13**(4): p. 725-9.
12. Lecault, V., et al., *Microfluidic single cell analysis: from promise to practice*. Current Opinion in Chemical Biology, 2012. **16**(3-4): p. 381-390.
13. Roman, G.T., et al., *Single-cell manipulation and analysis using microfluidic devices*. Anal Bioanal Chem, 2007. **387**(1): p. 9-12.
14. Lindstrom, S. and H. Andersson-Svahn, *Overview of single-cell analyses: microdevices and applications*. Lab Chip, 2010. **10**(24): p. 3363-72.
15. Hong, S., Q. Pan, and L.P. Lee, *Single-cell level co-culture platform for intercellular communication*. Integr Biol (Camb), 2012. **4**(4): p. 374-80.

16. Jeon, N.L., et al., *Generation of Solution and Surface Gradients Using Microfluidic Systems*. Langmuir, 2000. **16**(22): p. 8311-8316.
17. Kee, S.P. and A. Gavriilidis, *Design and characterisation of the staggered herringbone mixer*. Chemical Engineering Journal, 2008. **142**(1): p. 109-121.
18. Zhou, J., A.V. Ellis, and N.H. Voelcker, *Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices*. Electrophoresis, 2010. **31**(1): p. 2-16.
19. Xu, Y. and F.C. Szoka, Jr., *Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection*. Biochemistry, 1996. **35**(18): p. 5616-23.
20. Ishii, T., Y. Okahata, and T. Sato, *Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1514**(1): p. 51-64.
21. Sun, W.H., et al., *In vivo cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(7): p. 2889-2893.
22. Mann, M.J., et al., *Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial*. The Lancet, 1999. **354**(9189): p. 1493-1498.
23. Praveen, B.B., et al., *Enhancement and optimization of plasmid expression in femtosecond optical transfection*. J Biophotonics, 2011. **4**(4): p. 229-35.
24. Ziv, R., et al., *Micro-electroporation of mesenchymal stem cells with alternating electrical current pulses*. Biomed Microdevices, 2009. **11**(1): p. 95-101.
25. Wei, Z., et al., *A laminar flow electroporation system for efficient DNA and siRNA delivery*. Anal Chem, 2011. **83**(15): p. 5881-7.
26. Ma, N., et al., *Integrated optical transfection system using a microlens fiber combined with microfluidic gene delivery*. Biomed Opt Express, 2010. **1**(2): p. 694-705.
27. Wu, N. and M.M. Ataii, *Production of viral vectors for gene therapy applications*. Curr Opin Biotechnol, 2000. **11**(2): p. 205-8.
28. Nishikawa, T., et al., *Construction of a gene screening system using giant unilamellar liposomes and a fluorescence-activated cell sorter*. Anal Chem, 2012. **84**(11): p. 5017-24.
29. Pezzoli, D., et al., *Chitosan-graft-branched polyethylenimine copolymers: influence of degree of grafting on transfection behavior*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34711.
30. Eliyahu, H., Y. Barenholz, and A. Domb, *Polymers for DNA Delivery*. Molecules, 2005. **10**(1): p. 34-64.
31. Hansen, C. and S.R. Quake, *Microfluidics in structural biology: smaller, faster em leader better*. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(5): p. 538-44.
32. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 368-73.

33. Breslauer, D.N., P.J. Lee, and L.P. Lee, *Microfluidics-based systems biology*. Mol Biosyst, 2006. **2**(2): p. 97-112.
34. Andersson, H. and A. van den Berg, *Microfabrication and microfluidics for tissue engineering: state of the art and future opportunities*. Lab Chip, 2004. **4**(2): p. 98-103.
35. Fox, M.B., et al., *Electroporation of cells in microfluidic devices: a review*. Anal Bioanal Chem, 2006. **385**(3): p. 474-85.
36. Marchington, R.F., et al., *Optical injection of mammalian cells using a microfluidic platform*. Biomedical Optics Express, 2010. **1**(2): p. 527-536.
37. Wang, D. and S. Bodovitz, *Single cell analysis: the new frontier in omics* Trends in biotechnology, 2010. **28**(6): p. 281-290.
38. Davey, H.M. and D.B. Kell, *Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses*. Microbiol Rev, 1996. **60**(4): p. 641-96.
39. Brehm-Stecher, B.F. and E.A. Johnson, *Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies, and Applications*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004. **68**(3): p. 538-559.
40. Andersson, H. and A. van den Berg, *Microtechnologies and nanotechnologies for single-cell analysis*. Current Opinion in Biotechnology, 2004. **15**(1): p. 44-49.
41. Yi, C., et al., *Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells*. Analytica Chimica Acta, 2006. **560**(1-2): p. 1-23.
42. Andersson, H. and A. van den Berg, *Microfluidic devices for cellomics: a review*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2003. **92**(3): p. 315-325.
43. Valero, A., et al., *Apoptotic cell death dynamics of HL60 cells studied using a microfluidic cell trap device*. Lab Chip, 2005. **5**(1): p. 49-55.
44. Wheeler, A.R., et al., *Microfluidic device for single-cell analysis*. Anal Chem, 2003. **75**(14): p. 3581-6.
45. Burger, R., et al., *Array-based capture, distribution, counting and multiplexed assaying of beads on a centrifugal microfluidic platform*. Lab Chip, 2012. **12**(7): p. 1289-95.
46. Lawrenz, A., F. Nason, and J.J. Cooper-White, *Geometrical effects in microfluidic-based microarrays for rapid, efficient single-cell capture of mammalian stem cells and plant cells*. Biomicrofluidics, 2012. **6**(2): p. 24112-2411217.
47. Rettig, J.R. and A. Folch, *Large-scale single-cell trapping and imaging using microwell arrays*. Anal Chem, 2005. **77**(17): p. 5628-34.
48. Hanke, C., et al., *Monitoring induced gene expression of single cells in a multilayer microchip*. Anal Bioanal Chem, 2012. **402**(8): p. 2577-85.

49. Di Carlo, D., N. Aghdam, and L.P. Lee, *Single-cell enzyme concentrations, kinetics, and inhibition analysis using high-density hydrodynamic cell isolation arrays*. *Anal Chem*, 2006. **78**(14): p. 4925-30.
50. Zhu, L., et al., *Filter-based microfluidic device as a platform for immunofluorescent assay of microbial cells*. *Lab Chip*, 2004. **4**(4): p. 337-41.
51. Mohamed, H., et al., *Development of a rare cell fractionation device: application for cancer detection*. *IEEE Trans Nanobioscience*, 2004. **3**(4): p. 251-6.
52. Yamaguchi, Y., et al., *Development of a poly-dimethylsiloxane microfluidic device for single cell isolation and incubation*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009. **136**(2): p. 555-561.
53. Stroock, A.D., et al., *Chaotic Mixer for Microchannels*. *Science*, 2002. **295**(5555): p. 647-651.
54. Di Lin, F.H., Yang Liao, Jintian Lin, Changning Liu, Jiangxin Song, Ya Cheng, *Three-dimensional staggered herringbone mixer fabricated by femtosecond laser direct writing*. *The Kinematics of Mixing: Stretching, Chaos, and Transport*, 2013. **15**.
55. Williams, M.S., K.J. Longmuir, and P. Yager, *A practical guide to the staggered herringbone mixer*. *Lab on a Chip*, 2008. **8**(7): p. 1121-1129.
56. Becker, H. and C. Gartner, *Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems*. *Anal Bioanal Chem*, 2008. **390**(1): p. 89-111.
57. McDonald, J.C. and G.M. Whitesides, *Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices*. *Acc Chem Res*, 2002. **35**(7): p. 491-9.
58. Satyanarayana, S., R.N. Karnik, and A. Majumdar, *Stamp-and-stick room-temperature bonding technique for microdevices*. *Microelectromechanical Systems, Journal of*, 2005. **14**(2): p. 392-399.
59. Eddings, M.A., M.A. Johnson, and B.K. Gale, *Determining the optimal PDMS-PDMS bonding technique for microfluidic devices*. *Zebrafish*, 2008. **6**(2): p. 201.
60. Summerford, C., J.S. Bartlett, and R.J. Samulski, *AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection*. *Nat Med*, 1999. **5**(1): p. 78-82.