

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Sistemi

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica



**PROGETTAZIONE DI UN DISPOSITIVO
MICROFLUIDICO PER L'ISOLAMENTO DI CELLULE
MESENCHIMALI DAL MIDOLLO OSSEO E
DEFINIZIONE DEL PROTOCOLLO DI
PRETRATTAMENTO DEL CAMPIONE BIOLOGICO**

Relatore: Prof. Gabriele DUBINI

Correlatore: Ing. Elena BIANCHI, PhD

Ing. Chiara ARRIGONI, PhD

Tesi di Laurea Specialistica di:

Alice MARI Matricola 799287

Carla SAMA' Matricola 798585

Anno Accademico 2013-2014

Indice

Sommario	I
Summary	XI
Capitolo 1	
Introduzione generale	1
1.1 Ambito generale del lavoro di tesi.....	2
1.2 Stato dell'arte.....	2
1.2.1 Cellule staminali mesenchimali.....	2
1.2.2 La microfluidica.....	9
1.2.3 Tecniche di separazione.....	15
1.2.3.1 Metodi tradizionali di separazione:.....	16
1.2.3.2 Nuovi metodi di separazione in sviluppo.....	17
1.2.3.3 Microfluidica.....	19
1.2.4 Analisi computazionali per lo studio della microfluidica.....	39
1.3 Descrizione del problema e obiettivi del lavoro.....	42
Capitolo 2	
Caratterizzazione e ottimizzazione delle proprietà del campione biologico	43
2.1 Introduzione.....	44
2.2 Problematiche e obiettivi specifici.....	44
2.3 Materiali e metodi.....	45
2.3.1 Protocolli di isolamento delle cellule mesenchimali.....	45
2.3.2 Valutazione dei parametri di colonialità e differenziamento.....	51
2.3.4 Analisi statistica.....	56
2.4 Risultati.....	57
2.4.1 Caratteristiche del campione trattato.....	57
2.4.2 Resa.....	60
2.4.3 Colonialità.....	63
2.4.4 Differenziamento.....	66
2.5 Conclusioni e sviluppi futuri.....	78
Capitolo 3	
Simulazioni computazionali per la progettazione del microdispositivo	80
3.1 Introduzione.....	81
3.2 Obiettivi.....	81
3.3 Materiali e Metodi.....	81
3.3.1 Design del dispositivo: progettazione e ottimizzazione.....	81
3.4 Risultati.....	90
3.5 Conclusioni e sviluppi futuri.....	109
Capitolo 4	
Conclusioni e sviluppi futuri	111
Appendice	114
Bibliografia	136

Sommario

Introduzione

L'applicazione in clinica delle MSCs (Mesenchymal Stem Cells) rappresenta una delle frontiere più innovative della medicina [Sutton et al.,2014][Farini et al.,2014][Murphy et al.,2013] e in particolare della medicina rigenerativa.

Una cellula staminale è una cellula in grado di generare sia cellule figlie identiche alla cellula madre, sia cellule figlie differenziate lungo una o più linee cellulari.

Tutti i tessuti sono popolati da cellule staminali, con diverso potenziale proliferativo. Una volta isolate esse possono essere manipolate e fatte differenziare in vitro. Le loro caratteristiche antiinfiammatorie, antimicrobiche, antifibrotiche e rigenerative, infatti, ne rendono la gamma di applicazioni molto ampia: con le attuali conoscenze i tessuti che possono essere trattati con cellule staminali comprendono l'osso, la pelle, la cartilagine, il polmone, il pancreas, il fegato, il tessuto nervoso e dei tessuti dei sistemi cardiocircolatorio e gastrointestinale. Attualmente sono in corso trial clinici e studi preclinici per comprenderne l'effettiva potenzialità nella cura di malattie tra le quali diabete, fibrosi cistica, asma, sclerosi laterale amiotrofica.

Il midollo osseo è tra i tessuti adulti che costituiscono una principale fonte di cellule staminali per l'ingegneria tissutale (1 staminale/10⁵ cellule) [Mantero et al.,2009]; in esso risiedono le linee staminali ematopoietica e mesenchimale. [Pittenger et al.,1999]. Il criterio comunemente accettato per definire una cellula staminale mesenchimale è l'abilità che essa ha di formare tessuto osseo, cartilagineo e adiposo; parecchi studi hanno dimostrato che le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo possono essere piastrate in coltura e creare colonie di cellule derivanti da singole cellule. [Bianco et al.,2001] Queste colonie sono multipotenti e possono essere indotte a diventare in vitro osso, cartilagine o grasso per mezzo di semplici procedure di coltura. [Park et al.,1999] [Kuznetsov et al.,2001] La modalità di isolamento delle MSCs comunemente utilizzata è la tecnica dell'adesione statica su piastra di coltura. Tuttavia sono oggetto di studio modalità alternative che permettano una maggiore purezza ed efficienza di selezione di tale componente cellulare, tra i quali l'utilizzo di tecniche microfluidiche.

La microfluidica è la scienza e l'insieme di tecnologie in grado di trattare piccole quantità di fluido (10⁻⁶/10⁻¹⁰ litri) usando canali di dimensioni che vanno dalle decine alle centinaia di micrometri. I vantaggi di questa tecnologia sono quelli poter di trattare piccole quantità di campione e di reagente e di poter selezionare particelle di dimensioni molto piccole con grande risoluzione e sensibilità, basso costo, tempi di analisi limitati. [Whitesides et al.,2006] La tecnica comunemente utilizzata per

la fabbricazione di dispositivi microfluidici è la soft-lithography, che consente in modo veloce ed efficace la realizzazione di microcanali in PDMS (polidimetil-silossano), polimero biocompatibile e poco costoso adatto alla realizzazione di prototipi e dispositivi microfluidici che processano campioni biologici. La microfluidica trova molti campi di applicazione tra cui le tecniche di cell sorting, ossia tecniche volte all'*isolamento* di un determinata componente cellulare all'interno di un campione biologico.

Esistono varie tecniche di cell sorting che possono essere classificate in tecniche basate su parametri fisici del campione o su affinità biochimiche. Oltre a queste tecniche tradizionali esistono metodi in via di sviluppo tra i quali l'adesione selettiva tramite l'utilizzo di aptameri specifici. [Zhu et al.,2013]

Nella progettazione dei dispositivi microfluidici vengono comunemente usati, a monte della creazioni di prototipi sperimentali, i metodi di analisi computazionale fluidodinamica. Tramite questi è possibile calcolare in modo teorico i campi di velocità e i percorsi seguiti dalle linee di flusso all'interno del dispositivo prima della sua fabbricazione in modo da ottimizzarne il design, il flusso e le specifiche di progetto evitando numerose e costose indagini sperimentali. [Erickson et al.,2005]

Obiettivo

Questo elaborato di tesi si inserisce in un progetto di ricerca che prevede la collaborazione tra il Politecnico di Milano e l'Istituto Ortopedico Galeazzi di Milano per la realizzazione e lo sviluppo di un dispositivo microfluidico per l'isolamento di cellule staminali mesenchimali dal midollo osseo umano tramite adesione selettiva con aptamero¹ specifico. Questa scelta è stata operata nell'ottica di integrare tecniche di microfluidica e di adesione selettiva per riuscire a isolare nel modo più efficace tale tipologia cellulare, il cui utilizzo risulta essere molto promettente per il futuro delle scienze mediche.

Il lavoro svolto si compone di una parte sperimentale e in una computazionale.

La parte sperimentale ha l'obiettivo di scegliere un protocollo di pretrattamento del campione di midollo osseo, dal quale si vogliono selezionare le cellule staminali mesenchimali, che permetta di non alterare le proprietà delle cellule mesenchimali del campione rendendolo allo stesso tempo più adatto in termini di viscosità e caratteristiche fisiche ad essere inserito in un dispositivo di microfluidica. A tal fine vengono analizzati due differenti protocolli di isolamento delle cellule

¹ Acido nucleico artificiale avente la proprietà di legarsi a una molecola o a una proteina.

staminali mesenchimali rispetto al protocollo standard, per comprendere se e come tali procedure influenzano le caratteristiche del campione cellulare.

La parte computazionale ha come obiettivo la progettazione e l'ottimizzazione della geometria di un dispositivo microfluidico che crei le condizioni più favorevoli per l'interazione della componente cellulare da selezionare con l'aptamero specifico che si intende utilizzare per effettuare un'adesione selettiva, immobilizzato su una superficie.

Parte sperimentale

Materiali e metodi

L'isolamento delle cellule staminali mesenchimali dal midollo osseo presso i laboratori di ricerca dell'Istituto Ortopedico Galeazzi avviene a partire da pezzi ossei di scarto provenienti da pazienti sottoposti a operazioni chirurgiche di impianto di protesi d'anca. In questa parte dell'elaborato ci si propone di confrontare il protocollo normalmente usato per l'isolamento delle MSCs (Standard) con due protocolli alternativi individuati per rendere il campione adatto all'inserimento in un dispositivo microfluidico (Filtrato e Lisato). Il protocollo Filtrato si differenzia da quello Standard per l'uso di un filtro di 100 μm che ha l'obiettivo di eliminare i coaguli più grossi e rendere il campione più omogeneo. Il protocollo Lisato prevede la rottura dei globuli rossi, che rappresentano una componente cellulare numerosa del campione, consentendo una prima selezione del campione. Questo protocollo inoltre rende il campione meno viscoso e più omogeneo rispetto ai due trattamenti precedenti, tuttavia i tempi della procedura aumentano dell'80%.

Poichè non è possibile stabilire a priori se tali protocolli alterino le caratteristiche del campione cellulare, dopo il pretrattamento con i diversi protocolli i campioni vengono messi in coltura per l'analisi e il confronto delle proprietà di resa, colonialità e differenziamento osteogenico e adipogenico, ritenute le più significative per descrivere e caratterizzare il campione. Il parametro di resa del campione è definito dalla formula seguente: $R = \frac{N_{\text{cell P1}}}{V_{\text{midollo}} * t}$, dove $N_{\text{cell P1}}$ è il numero di cellule che vengono contate dopo essere state staccate dalla piastra di coltura (cellule al passaggio 1), V_{midollo} è il volume di midollo iniziale, t è il numero di giorni che intercorrono tra quando le cellule vengono piastrate a quando vengono staccate. La colonialità, ovvero la capacità delle cellule di formare colonie, viene valutata tramite la conta delle colonie formatesi evidenziate dalla colorazione con Crystal Violet effettuata dopo aver mantenuto in coltura le cellule. Viene valutata inoltre la capacità di differenziamento (capacità di una cellula non specializzata di evolvere in una particolare cellula differenziata) osteogenico e adipogenico. A tal fine le cellule isolate vengono messe in coltura con mezzi specifici per indurre un dato differenziamento. Dopo aver effettuato la

colorazione con Alzarin Red-S per evidenziare il differenziamento osteogenico e con Oil-Red-O per quello adipogenico, il differenziamento viene valutato qualitativamente, attraverso immagini al microscopio ottico in campo chiaro, e quantitativamente attraverso l'estrazione tramite il colorante e l'analisi della soluzione ottenuta allo spettrofotometro.

Al fine di effettuare un'analisi statistica dei risultati vengono presi in analisi campioni di midollo osseo di otto pazienti. Quattro campioni sono stati sottoposti ai protocolli Standard e Filtrato, quattro ai protocolli Standard e Lisato. Il fatto che il confronto tra protocollo Standard e protocolli diversi sia fatto sullo stesso paziente rende i risultati affidabili. I risultati numerici ottenuti dagli esperimenti vengono analizzati tramite il metodo del T-test accoppiato per misure ripetute a due code e il test ANOVA.

Risultati

Dal calcolo della resa dei campioni e dagli esperimenti di colonialità emerge che non c'è differenza statisticamente significativa nell'uso tre diversi protocolli di trattamento del campione. (Figura A)

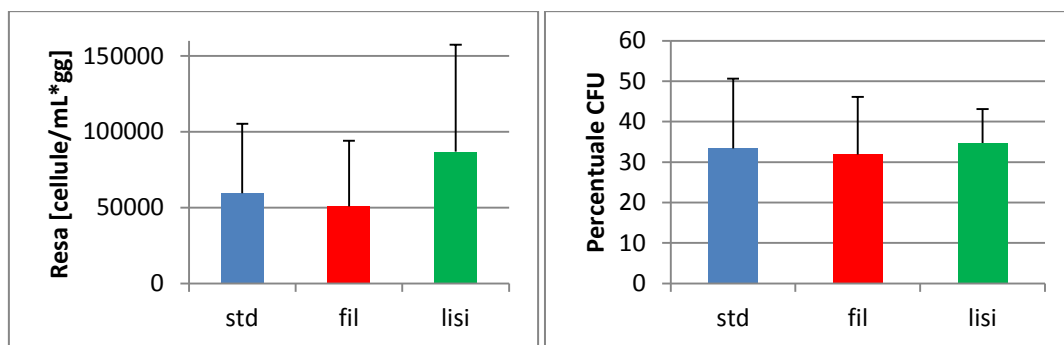


Figura A Istogramma con media e deviazione della resa cellulare (a sinistra) e della colonialità (a destra) per i campioni trattati con protocollo Standard (STD), di Lisi (LIS) e Filtrato (FIL). Dal test ANOVA sui dati dei tre gruppi non emergono differenze statisticamente significative.

Dall'analisi qualitativa delle immagini al microscopio dopo la colorazione Oil-Red-O per evidenziare la presenza di vacuoli di grasso, indice del differenziamento adipogenico, non emerge alcuna differenza evidente tra i vari protocolli (Figura B). Tale osservazione viene confermata dall'analisi statistica dei dati numerici dei valori di assorbanza estratti. (Figura C)

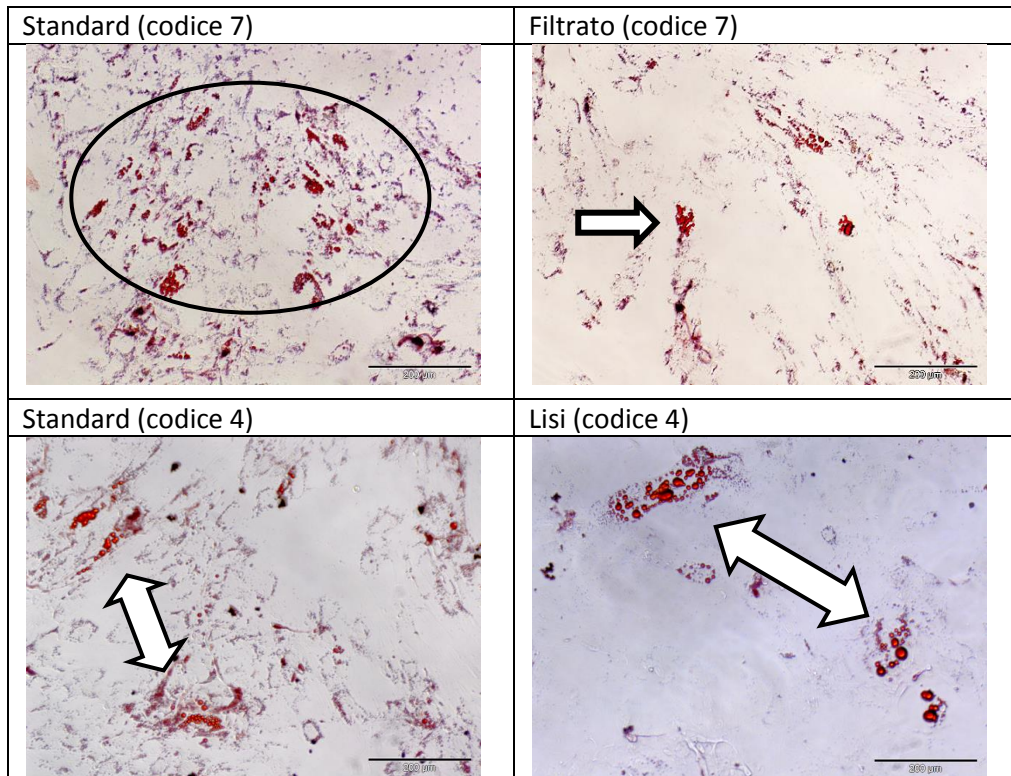


Figura B. Immagini al microscopio dei pozzetti dopo la colorazione Oil-Red-S. Confronto tra le procedure Standard e Filtrato in alto, Standard e Lisi in basso. Le frecce e i cerchi evidenziano i vacuoli di grasso.

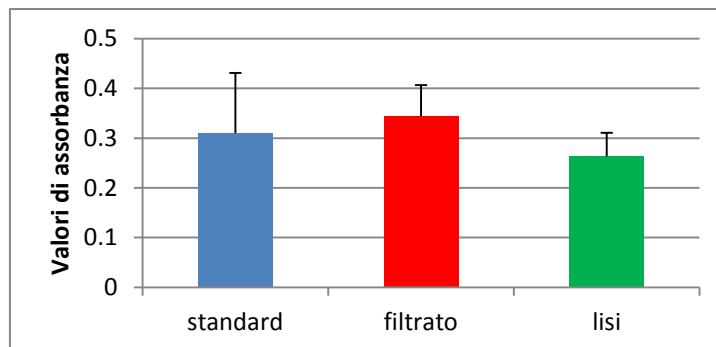


Figura C Istogrammi con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni trattati con protocollo Standard, Filtrato e di Lisi. Dal test ANOVA sui dati dei tre gruppi non emergono differenze statisticamente significative.

Dall'analisi qualitativa delle immagini scattate al microscopio dopo la colorazione Alzarin-Red-S per evidenziare la presenza di depositi di matrice ossea, indice del differenziamento osteogenico, non emerge una differenza evidente tra i vari protocolli (Figura D). L'analisi statistica dei dati numerici dei valori di assorbanza estratti conferma che non c'è alcuna differenza statisticamente significativa, tuttavia è possibile osservare la presenza di un trend: il protocollo di Lisi presenta valori di assorbanza maggiori (Figura E).

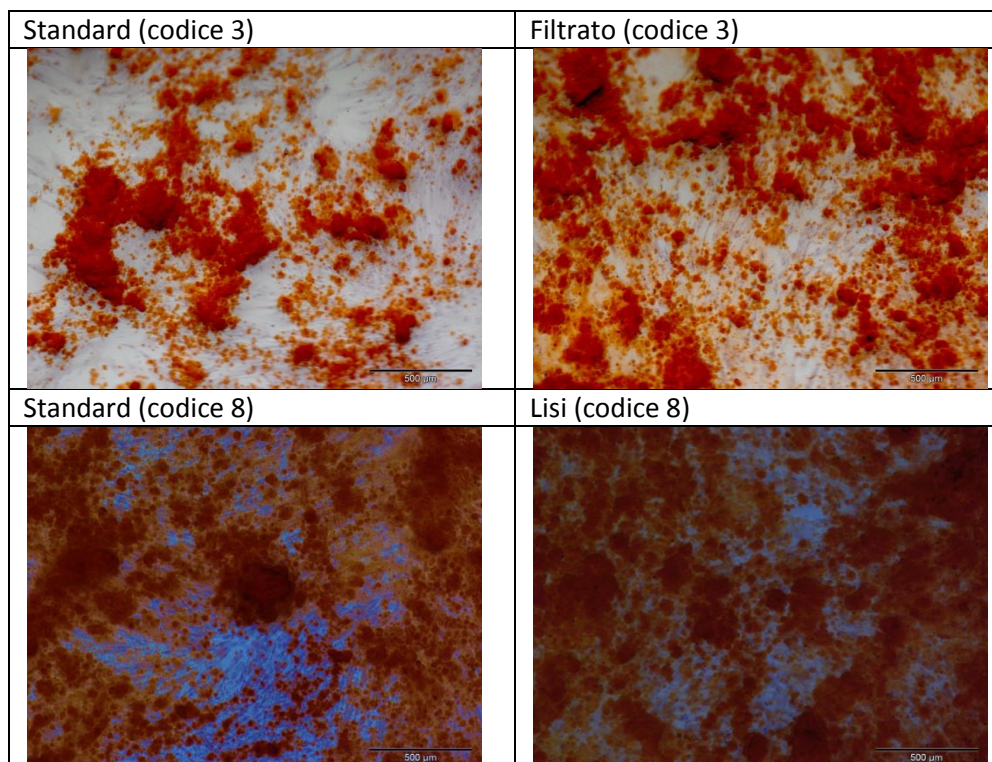


Figura D Immagini al microscopio dei pozzetti dopo la colorazione Alzarin-Red-S. Confronto tra le procedure Standard e Filtrato in alto, Standard e Lisi in basso.

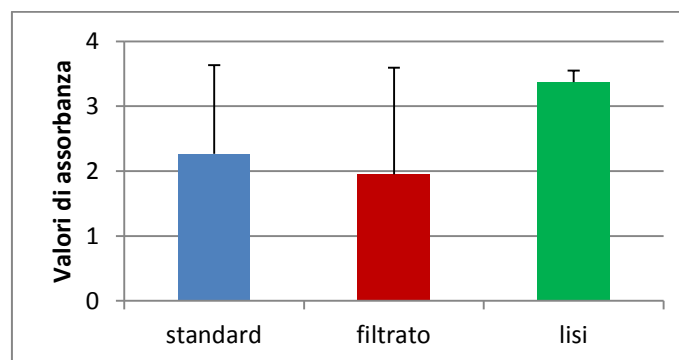


Figura E Istogrammi con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni trattati con protocollo Standard (STD), Filtrato (FIL) e di Lisi (LISI). Dal test ANOVA sui dati dei tre gruppi non emergono differenze statisticamente significative.

Parte computazionale

Materiali e metodi

Questa parte di elaborato si occupa della progettazione e l'ottimizzazione della geometria di un dispositivo microfluidico sfruttando l'utilizzo di software computazionali: Fluent (*Ansys Inc., Canonsburg, PA, USA*) per l'analisi fluidodinamica della fase continua e Comsol Multiphysics per l'analisi del comportamento cellulare all'interno del dispositivo. A partire da specifiche di progetto individuate, in particolare dal fatto che una zona del fondo del dispositivo dovesse essere ricoperta con un aptamero specifico per selezionare le MSCs per adesione selettiva, si è ipotizzata una

possibile geometria che prevede il raccordo di inlet e outlet del dispositivo alla zona adesiva ipotizzata di forma rettangolare di dimensioni 3 cm x 2 cm con due possibili angolazioni (15° e 30°) (Figura F). L'altezza del dispositivo scelta è di 500 μm. La portata ritenuta ragionevole per poter processare un volume adeguato di campione in tempi accettabili è di 10 mL/h. Per l'analisi discreta vengono inserite un numero di particelle che consentano di avere una densità cellulare di 10⁵ cells/mL e le caratteristiche di densità e diametro che meglio descrivono il campione.

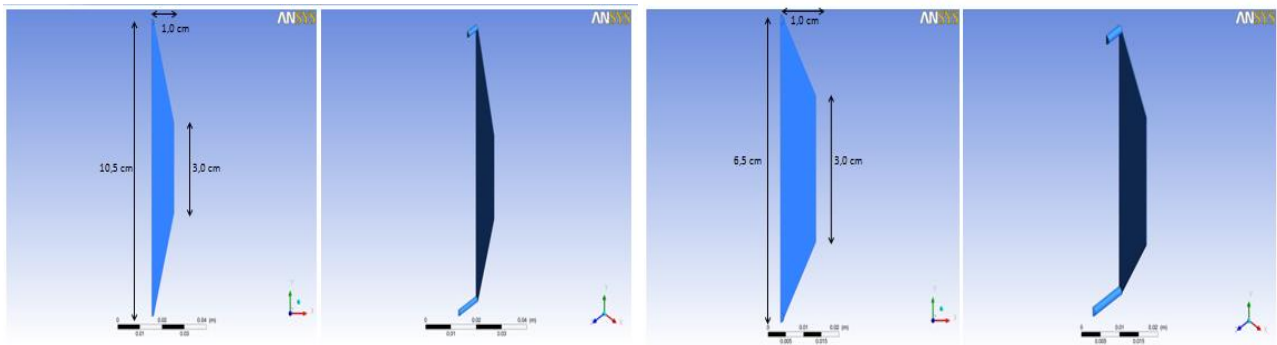


Figura F Immagini della geometria del dispositivo con angolo di raccordo di 15° (a sinistra) e 30° (a destra).

Una volta scelta la geometria che garantisca una maggiore omogeneità di flusso che permette di avere un comportamento delle particelle simile e minori zone di ristagno (variazioni di velocità inferiori al 2.5% rispetto al valore massimo sulla linea media del dispositivo) nella zona adesiva, si è passati alla ricerca della tecnica migliore per concentrare le cellule nella zona adesiva evitando le zone di ristagno e per favorire l'interazione di queste ultime con l'aptamero. A tal fine vengono effettuate simulazioni con quattro tipologie di focusing orizzontale (Figura G) e tre di focusing verticale (Figura H). Il focusing orizzontale si effettua aggiungendo nel dispositivo un canale laterale al cui interno scorre fluido privo di particelle. La scelta della posizione e della portata inserita in tale canale influenza la larghezza della parte della geometria attraversata dalla componente cellulare. Il focusing verticale, invece, consiste nell'aggiungere un canale di solo fluido a valle dell'ingresso del campione cellulare per costringere le cellule verso la base del dispositivo trattata con l'aptamero.

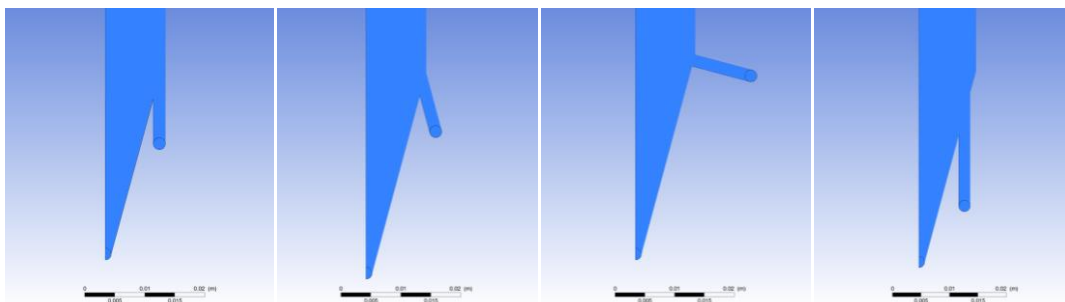


Figura G Immagini delle quattro tipologie di focusing orizzontale analizzate.

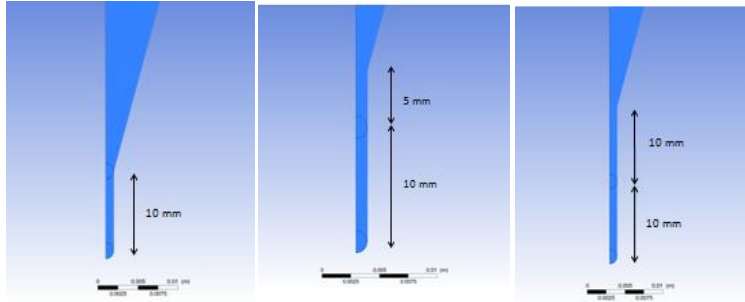


Figura H Immagini delle tre tipologie di focusing verticale analizzate.

In seguito alla scelta della geometria migliore vengono condotte simulazioni variando le portate nei vari inlet e le caratteristiche delle particelle (densità e diametro) per valutare l'influenza di questi parametri sul funzionamento del dispositivo.

Risultati

Dall'analisi delle mappe di velocità delle due geometrie con diverso angolo di raccordo emerge che la zona a flusso omogeneo (zone verdi in Figura I) è maggiore nel caso della geometria con angolo di raccordo di 15° e che ci sono due zone di ristagno.

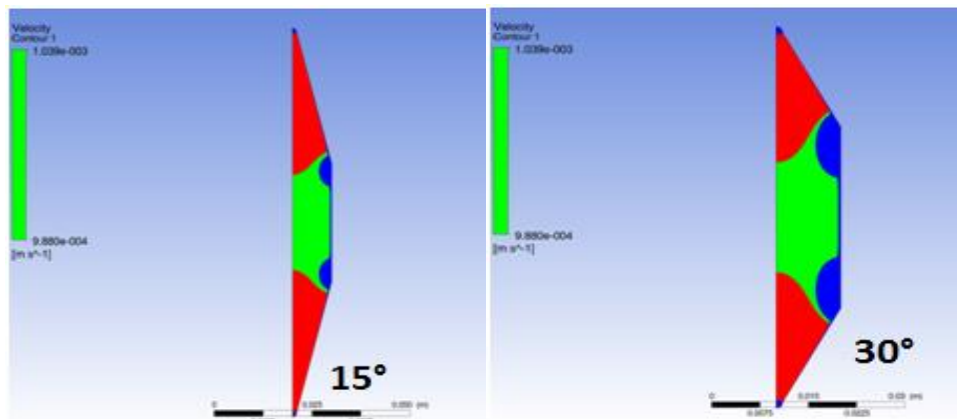


Figura I Contours di velocità sul piano medio del dispositivo per le due geometrie di base. In verde sono evidenziate le zone dove i valori di velocità non si discostano più del 2.5% dal valore massimo sulla linea media.

La scelta tra le varie tipologie di focusing orizzontale, in base alle analisi dei contours di velocità e delle linee di flusso, ricade sul canale posto alla fine del divergente e inserito parallelamente al flusso contenente particelle. Il rapporto tra le portate di focusing orizzontale e dell'ingresso contenente il campione pari a 0.25 permette di confinare le particelle nel 65% della larghezza della camera, come confermato dall'analisi fluidodinamica della fase continua e discreta (Figura L).

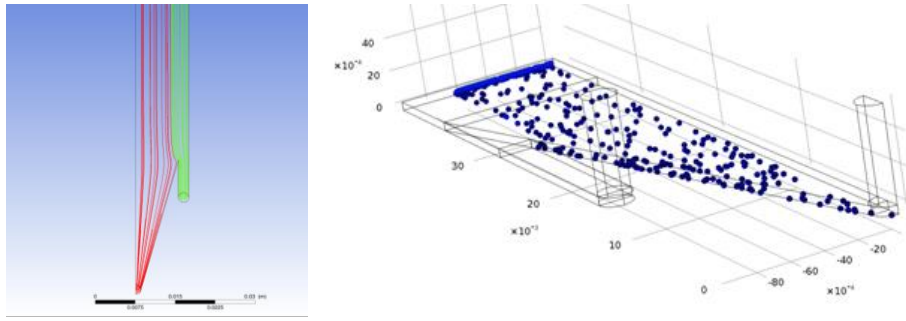


Figura L A sinistra: in rosso linee di flusso del fluido contenente particelle, in verde linee di flusso del focusing orizzontale. A destra: screenshot della simulazione Comsol della fase discreta.

Nelle simulazioni effettuate per indagare quale sia la strategia di focusing verticale migliore si imposta una portata di focusing che è la metà della portata del canale di inlet contenente il campione. Questo permette di costringere in modo efficace le particelle ad andare verso il fondo del canale. La geometria che consente un miglior focusing verticale in termini di omogeneità del flusso è quella con un canale di focusing a monte di 5 mm rispetto all’inizio del divergente e il canale contenente il campione 10 mm a monte rispetto ad esso (Figura M)

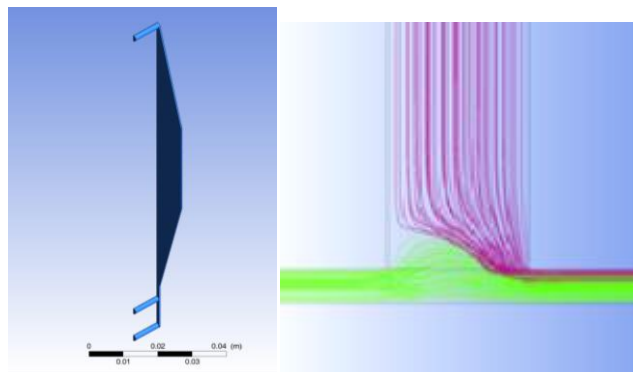


Figura M A sinistra: geometria del dispositivo con canale di focusing verticale scelta. A destra: le linee di flusso in fucsia rappresentano il flusso del canale di focusing, in verde quelle del canale di ingresso contenente le particelle.

In figura N si riporta la geometria finale dotata di canale di focusing verticale e orizzontale.

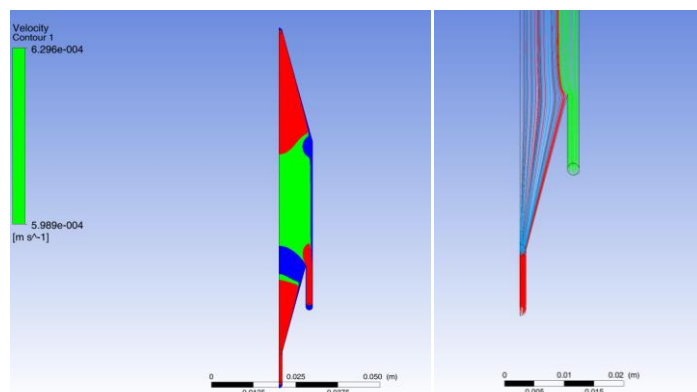


Figura N A sinistra: contours di velocità sul piano medio della geometria finale del dispositivo microfluidico. A destra: particolare del dispositivo: linee di flusso del canale contenente il campione cellulare (in rosso), del canale di focusing orizzontale (in verde) e del canale di focusing verticale (in azzurro).

Conclusioni

Dal lavoro di caratterizzazione sperimentale di campioni di midollo osseo proveniente da operazioni chirurgiche di impianto di protesi d'anca presso l'Istituto Ortopedico Galeazzi di Milano non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa nell'uso di tre protocolli di trattamento del campione che potrebbe alterare le sue caratteristiche in termini di resa, colonialità e differenziamento. Questo risultato permette di poter scegliere il protocollo che rende il campione più adatto al suo inserimento e trattamento nel dispositivo. Tra i protocolli considerati il protocollo di Lisi, pur necessitando di tempistiche maggiori, permette di ottenere campioni più omogenei e qualitativamente meno viscosi. Inoltre questo protocollo presenta il vantaggio di eliminare i globuli rossi dal campione consentendo una prima selezione. Pertanto sembra essere il più adatto tra i tre protocolli.

Passando alla fase di progettazione, la geometria del dispositivo ideata permette di concentrare efficacemente la sospensione cellulare nella zona target ricoperta dall'aptamero e aumentarne l'interazione con lo stesso attraverso le tecniche del focusing orizzontale e verticale e il design del dispositivo.

Nelle simulazioni computazionali condotte si è tenuto conto di avere una soluzione con densità di particelle di 10^5 cells/mL, dato presente in letteratura e considerato adeguato per dispositivi simili. [Hatch et al.,2012] [Karnik et al.,2008] [Lahann et al.,2003] [Plouffe et al.,2009] [Vickers et al.,2012] I dati sperimentali dicono che la media della densità cellulare dei campioni presi in esame è nell'ordine di 10^6 cells/mL per il protocollo di lisi. Pertanto il campione dovrebbe essere diluito dieci volte dopo aver seguito il protocollo e il volume finale da processare aumenterebbe a 50 mL. Considerando tale volume e una portata di $1.85 \cdot 10^{-9}$ m³/s per l'inlet contenente le cellule, nel dispositivo finale compreso di focusing laterale e verticale si impiegherebbero 7.5 ore di tempo per processare il campione. Nel caso fosse necessario diminuire i tempi del processo si potrebbe aumentare la portata aumentando la velocità della soluzione contenente il campione cellulare all'ingresso.

In conclusione mediante questo lavoro si è mostrato come può essere pretrattato il campione di midollo osseo per rendere adatto il suo inserimento in un dispositivo microfluidico senza alterare le proprietà delle cellule mesenchimali e si è inoltre scelta e analizzata una possibile geometria dello stesso che consenta di isolare le cellule mesenchimali tramite adesione selettiva.

Summary

Introduction

The clinical application of MSCs represents one of the most innovative challenge in medicine [Sutton et al.,2014][Farini et al.,2014][Murphy et al.,2013] and in particular in regenerative medicine.

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) have the ability to generate both undifferentiated cells and differentiated cells into one or more cell types. Stem cells can be isolated and inducted to differentiate in vitro. All human tissues are composed also by stem cells with a particular proliferative potential. MSCs have a promising future in many medical applications, in particular in regenerative medicine. There a lot of possible applications of MSCs in medicine, thanks to their anti-inflammatory, antifibrotic, antimicrobial and regenerative characteristics. At present a lot of clinical and preclinical trials are being conducted to understand the MSCs potential in the treatment of many diseases. Bone, liver, skin, cartilage, lungs, pancreas, the central nervous system, the gastrointestinal track and the circulatory system are examples of tissues that can be treated using the MSCs. Bone marrow represents a principal source of stem cells for tissue engineering (1 stem cell/ 10^5 cells) [Mantero et all,2009]; the mesenchymal and hematopoietic lineages are present in bone marrow [Pittenger et al.,1999]. The characteristic used to define a MSC is the ability to form bone, cartilaginous and adipose tissue. A great number of studies showed that bone marrow mesenchymal stem cells can be cultivated in vitro and they can create colonies from single cell. [Bianco et al.,2001] These colonies are multipotent and can be inducted to became bone, cartilaginous and adipose tissue in vitro with simple cell culture conditions. [Park et al.,1999] [Kuznetsov et al.,2001] The isolation of MSCs is usually done using the static adhesion on culture plates. However emerging novel methods are currently under development [Zhu et al.,2013]; these methods present higher purity and efficiency in the isolation of stem cells; one of these methods is microfluidics.

Microfluidics is the science and technology of systems that process small amounts of fluids ($10^{-6}/10^{-10}$ litres) using channels with dimensions of tens to hundreds of micrometres. The advantages of this technology include the possibility of using small quantities of sample and reagents, carrying out selection of really small particles with high resolution and sensitivity, low costs and short times of treatment. [Whitesides et al.,2006] Microfluidic devices are usually produced using soft-lithography technique. Soft-lithography permits the rapid and efficient realization of microchannels in PDMS (Polydimethylsiloxane), that is a cheap biocompatible

polymer; thanks to these characteristics it is useful for realization of prototypes and microfluidic devices that process biological samples. One of the possible application field of microfluidics is cell sorting, that consists in the selection of a particular cell type in a biological sample.

Cell sorting techniques are numerous and various; traditional techniques can be divided in physical parameters based methods and affinity based methods, in addition to these novel emerging methods are currently under development, like selective adhesion using specific aptamers [Zhu et al.,2013], that enable to select specifically rare cell types.

Computational fluid dynamics (CFD) software are generally used during the design of a microfluidic device, before the realization of experimental prototypes. CFD analysis permits to calculate velocity fields and streamlines before the fabrication of the device; they allow design and flow optimization, without numerous and expensive experimental analysis. [Erickson et al.,2005]

The aim of the work

This work is part of a research project in which Politecnico di Milano and Istituto Ortopedico Galeazzi located in Milan are in partnership in order to design and realize a microfluidic device that isolates mesenchymal stem cells from human bone marrow through the selective adhesion to a specific aptamer².

This choice was made as a way to integrate the science of microfluidics and the selective-adhesion technique in order to select this typology of cells, hoping that they will be very useful for the future of medicine.

This work is divided in an experimental and in a computational section.

The goal of the experimental section is to choose a pretreatment protocol of the sample of human bone marrow from that mesenchymal stem cells are isolated. The chosen protocol must not alter sample properties and must make suitable the insertion in terms of viscosity and physics characteristics in a microfluidic system. Two different protocols of isolation of mesenchymal stem cells are analyzed and compared to the protocol commonly used in laboratory in order to understand how the differences between protocols can influence properties of the cellular sample.

The aim of the computational section is to develop, design and optimize the geometry of a microfluidic device that makes simpler the interaction between the specific cellular components with the aptamer used for selective-adhesion.

² Nucleic acid able to link a molecule or a protein

Experimental section

Materials and methods

The isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow takes place at research laboratory of the Istituto Ortopedico Galeazzi. The bone marrow is obtained from scrap bone pieces of patients subjected to the implantation of hip prosthesis. The objective of this part of paper is the comparison between the common used protocol for the isolation of MSCs (Standard) and other two alternative protocols, identified to make the sample more appropriate for its insertion in a microfluidic device (Filtered and Lysed). The Filtered protocol is different from the Standard protocol because it includes the use of a 100 μm filter; the filter is used to eliminate the biggest clots and make the sample more homogeneous. The Lysed protocol permits the lysis of red blood cells, that represent a great cellular component of the sample, so it realizes a first sample selection. In addition this protocol makes the sample less viscous and more homogeneous compared to the other two treatments; however the procedure time increases about 80%.

After protocol treatment samples are cultured to analyse and compare their properties in terms of differentiation (osteogenic and adipogenic), formation of colonies and yield. These are considered the most important properties to describe the sample and understand if the protocols change sample characteristics. The yield parameter is defined by the following formula: $Y = \frac{N_{\text{cell P1}}}{V_{\text{marrow}} * t}$, where $N_{\text{cell P1}}$ is the number of cells counted after the detachment from the culture plate (cells at passage 1), V_{marrow} is the bone marrow initial volume, t is the number of days from cell planting and cell detaching. The cell ability to form colonies is determined counting the number of colonies formed, colored by Crystal Violet staining, after days of cell culture. The ability of adipogenic and osteogenic differentiation (capacity of unspecialized cell to evolve in a particular differentiated cell) is also evaluated. For this purpose isolated cells are cultured with specific mediums to induct differentiation. After Alzarin Red-S staining, that underlines osteogenic differentiation and Oil-Red-O staining, that underlines adipogenic differentiation, the differentiation is qualitatively valued by photos taken using microscope and quantitatively valued by extraction and analysis of culture wells using spectrophotometer.

Bone marrow samples of eight patients are taken to carry out a statistical analysis of results. Four samples are subjected to Standard and Filtered protocols, four samples are subjected to Standard and Lysed protocols. Results are reliable because the comparison between the Standard protocol and the other protocol is done using the sample from the same patient. The numerical results obtained by experiments are analyzed through two tailed coupled T-test for repeated measures and ANOVA test.

Results

The sample yields and coloniality experiments show that the difference between the three protocols isn't statistically significant (Figure A)

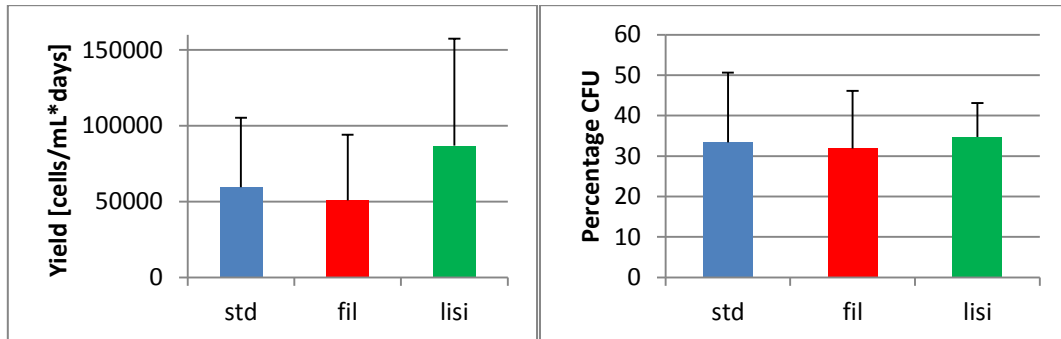


Figure A Histograms: average and deviation values of cell yield (left) and coloniality (right) for samples treated with Standard (STD), Filtered (FIL) and Lysed (LISI) protocols. ANOVA test shows that the difference is not statistically significant.

The qualitative analysis of the microscope images taken after Oil-Red-O staining (the staining underlines the presence of lipid vacuoles that are indicators of adipogenic differentiation) shows that there isn't an evident difference among the protocols (Figure B). This observation is confirmed by statistical analysis of numerical extracted values of absorbance (Figure C).

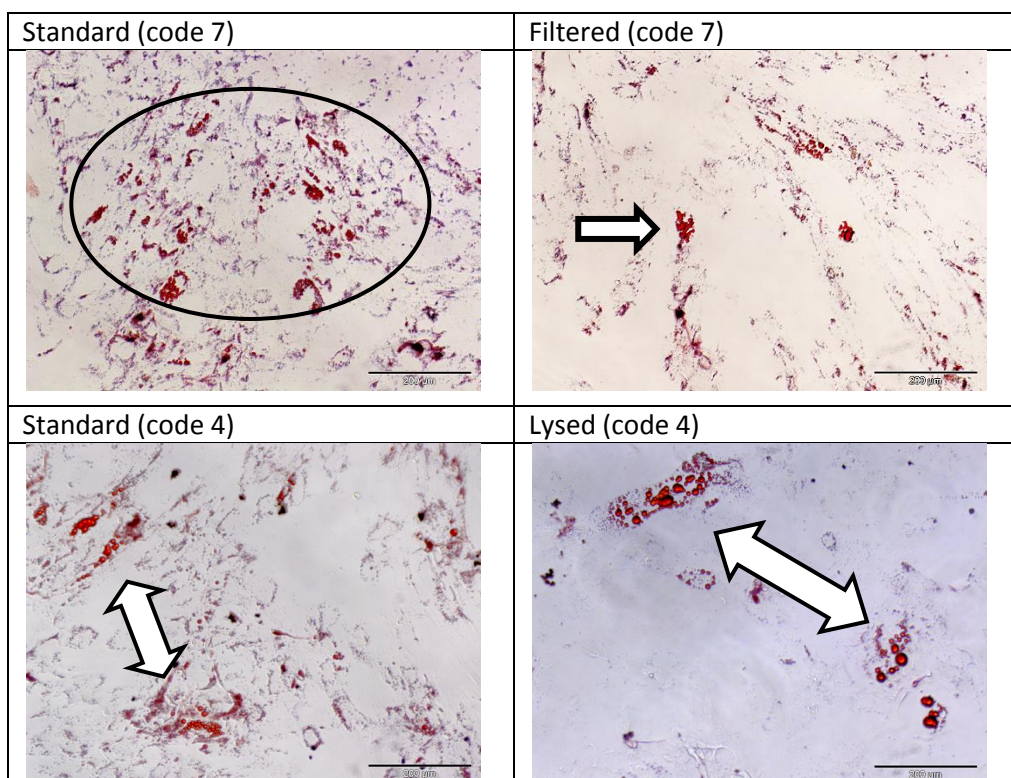


Figure B. Microscope images of wells after OIL-RED-S staining. Comparison between the Standard and Filtered protocols (top), Standard and Lysed protocols (bottom). Arrows underline the presence of lipid vacuoles.

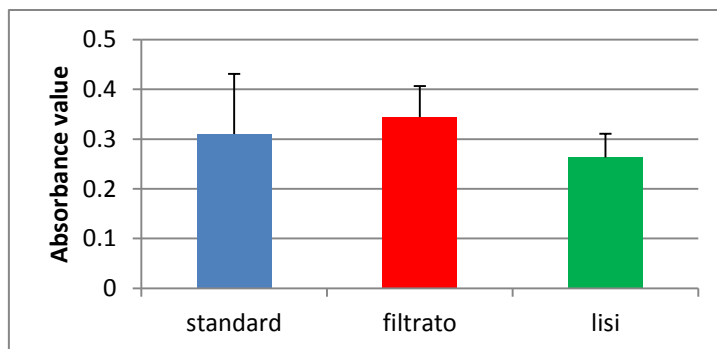


Figure C Histogram: average and deviation of absorbance values of samples treated with Standard (standard), Filtered (filtrato) and lysed (lisi) protocols. ANOVA test shows that the difference is not statistically significant.

The qualitative analysis of the microscope images taken after Alzarin-Red-S staining (the staining underlines the presence of bone matrix that are indicators of osteogenic differentiation) shows that there is not an evident difference among the protocols (Figure D). This observation is confirmed by statistical analysis of numerical extracted values of absorbance, however there is a trend: the Lysed protocol shows higher absorbance values (Figure E).

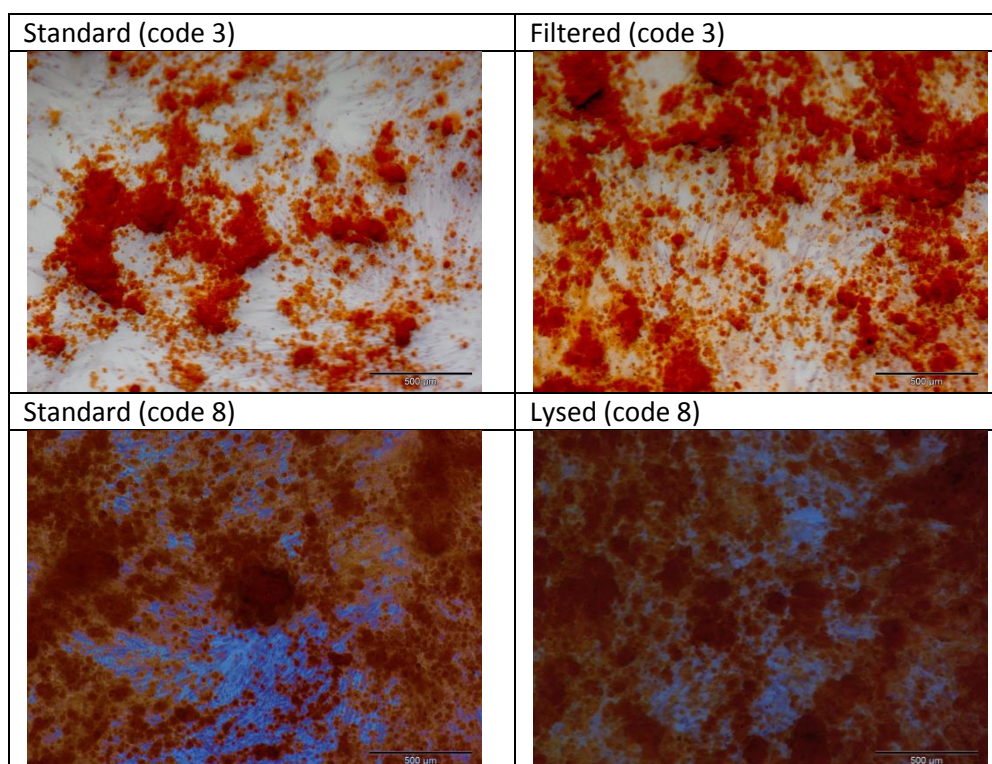


Figure D Microscope images of wells after Alzarin-Red-S staining. Comparison between the Standard and Filtered protocols (top) and Standard and Lysed protocols (bottom).

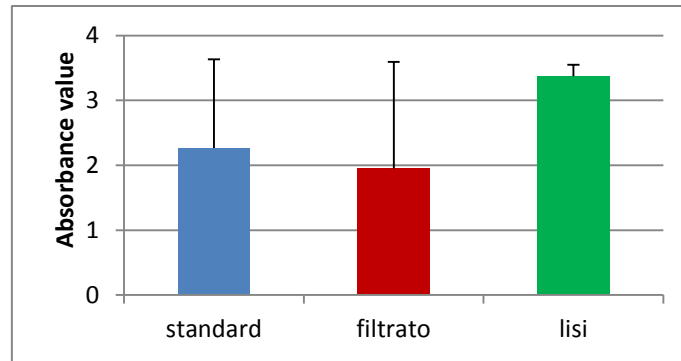


Figure E Histogram: average and deviation values of absorbance for sample treated with Standard protocol (standard), Filtered protocol (filtrato) and Lysed protocol (lisi). ANOVA test shows that the difference is not statistically significant.

Computational section

Materials and methods

The aim of this part is geometry design and optimization of a microfluidic device using two computational softwares: Fluent (*Ansys Inc., Canonsburg, PA, USA*) for the fluid dynamic analysis of the continuous phase and Comsol Multiphysics for the analysis of the cellular component inside the system. A possible geometry is chosen, starting from the identified design specifications, considering in particular that an area of the bottom-side of the device must be covered by a specific aptamer that selects MSCs through selective-adhesion technique. The adhesive area is rectangular in shape with dimensions of 3 cm x 2 cm. This area is connected to inlet and outlet of the device with a divergent with two possible angles (15° or 30°). The device is 500 μm high. The flow rate considered the best in order to process an adequate sample volume in the right time is 10 mL/h. A number of particles that assure a cellular density of 10^5 cells/mL and with density and diameter properties of the cellular sample are then inserted to simulate the discrete phase. (Figure F)

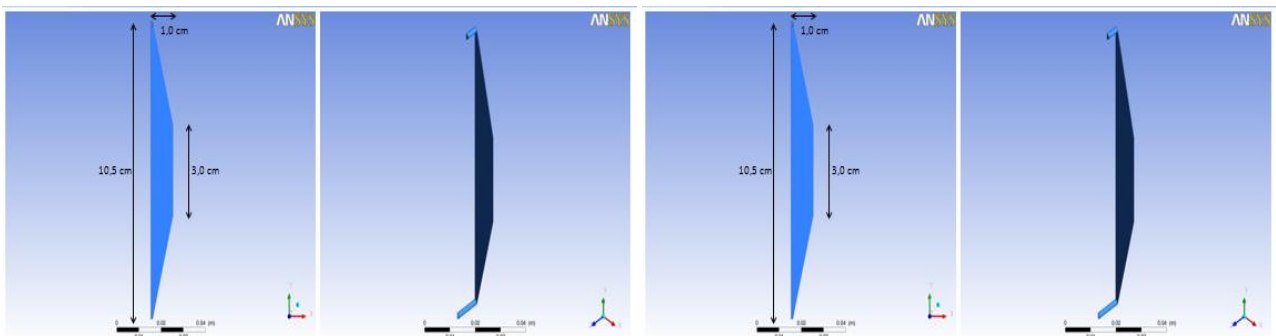


Figure F Images of the device with angles of fitting 15° (left) and 30° (right).

The geometry that allows the best conditions in terms of homogeneous flow (speed variations less than 2.5% compared to the maximum value of speed in the mid-line) in the adhesive area and less

stagnation areas is chosen. Then the best technique to concentrate particles in the adhesive area avoiding stagnation areas and to promote interaction between particles and aptamer is searched. Four types of horizontal hydrodynamic focusing (Figure G) and three types of vertical hydrodynamic focusing (Figure H) are analyzed with computational simulations. Horizontal focusing consists in adding a lateral channel in which buffer-fluid (with no particles) flows. The position and the flow rate of the lateral channel influences the width of the device through which particles pass. Vertical focusing consists in adding a buffer-fluid in a vertical channel downstream the inlet of the cellular sample in order to constrict cells towards the ground treated with aptamer.

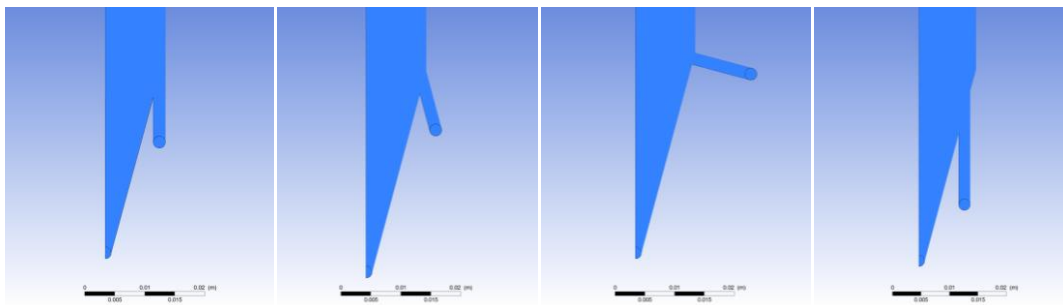


Figure G Images of the four types of horizontal focusing analyzed.

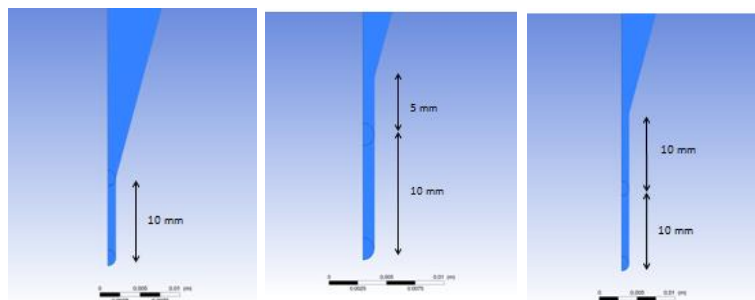


Figure H Images of the three types of vertical focusing analyzed.

The best geometry is chosen. Afterwards computational simulations varying flows rate in the channels and particles properties as density and diameter are made to evaluate the influence of those parameters to the behavior of the device.

Results

The geometry that allows the biggest area of homogeneous flow has got a junction angle of 15° as determined by the analysis of velocity contours in Figure I.

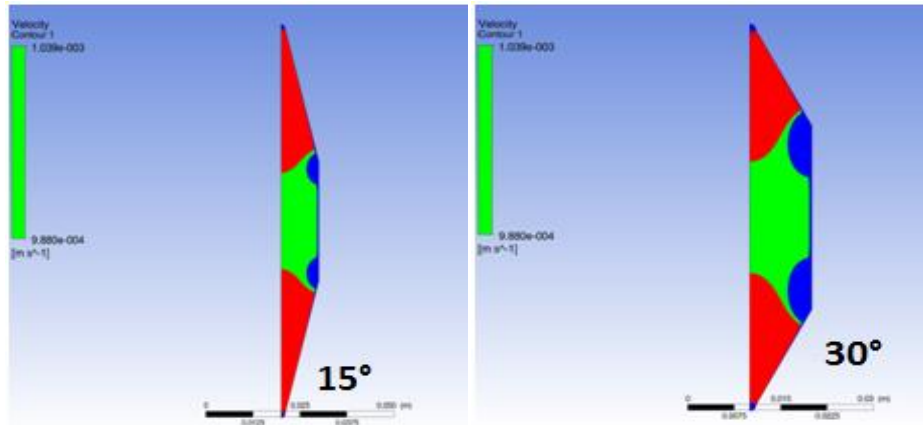


Figure I Velocity contours on the midplane for two types of base geometries. The areas in which velocity values differ less than 2.5% from the maximum value on the mid-line are green colored.

The best type of horizontal focusing is obtained, considering the analysis of velocity contours and the streamlines inside the device, the one with the channel at the end of the divergent in which buffer-fluid flows parallel to the flow of fluid with particles. A 0.25 ratio between horizontal focusing flow rate and inlet flow rate allows concentrating particle in the 65% of the width of the rectangular area. This fact is confirmed by fluid dynamics analysis of continuous and discrete phase. (Figure L)

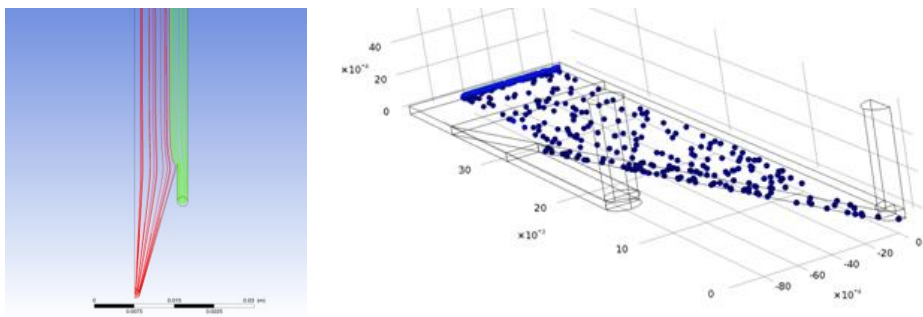


Figure L Left: red streamlines represent fluid with particles; green streamlines represent horizontal focusing fluid. Right: screenshot of Comsol simulation of discrete phase.

The ratio between the vertical focusing flow rate and inlet with particles flow rate is set to 0.5 in the computational simulations made in order to search which is the best strategy of vertical focusing. This value permits effectively to push particles towards the base of the device. The vertical focusing type that allows the best flow homogeneity is that with a vertical focusing channel placed 5 mm upstream the divergent and with the inlet containing particles 10 mm upstream. (Figure M)

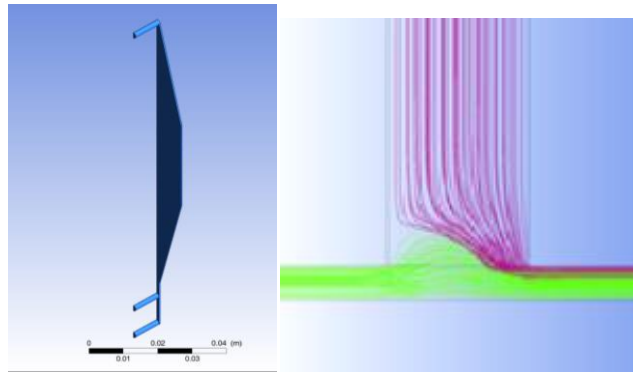


Figure M Left: geometry with the type of vertical focusing chosen. Right: pink streamlines represent vertical focusing fluid flow, green streamlines represent inlet with particles fluid flow.

Figure N represents the final geometry of the microfluidic device with channels of horizontal and vertical focusing.

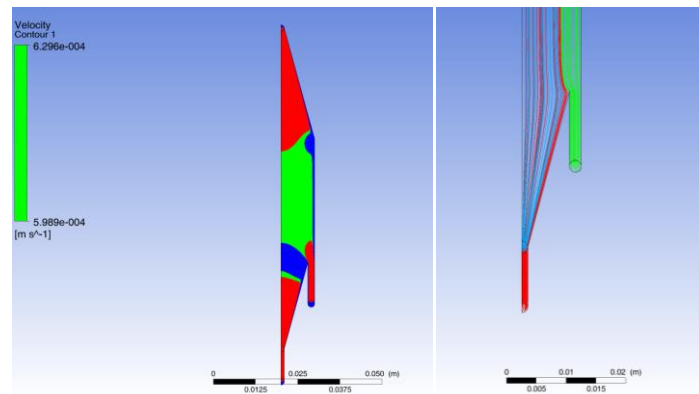


Figure N Left: velocity contours on the mid-plane for the final geometry of the device. Right: image of a detail of the device: streamlines of the fluid flow containing particles (red), streamlines of horizontal focusing fluid flow (green) and streamlines of vertical focusing fluid flow (light blue).

Conclusions

The experimental section of this work demonstrates that there is not a statistically significant difference in terms of yield, coloniality and differentiation among the three pretreatment protocols for isolation of mesenchymal stem cells from sample of bone marrow derived from hip replacement surgery at the Istituto Ortopedico Galeazzi. This result confirms that the protocol that makes the cellular sample more adapt to be inserted in a microfluidic system can be chosen without altering its properties. From the Lysed protocol is possible to obtain a more homogeneous and qualitatively less viscous sample, even if this protocol requires more time. A further advantage of the Lysed protocol is that red blood cells are eliminated and this can be considered as a first passage of selection of the sample. For these reasons it seems to be the best between the three protocols.

Regarding the design phase of the microfluidic system, the geometry chosen for the device is able to effectively concentrate the cell suspension in the target-area covered with the aptamer and to

improve interaction with it through the use of the horizontal and vertical focusing techniques and the design itself.

The computational simulations have been made setting a particles density solution of 10^5 cells/mL, a value present in literature articles and considered adapt for microfluidic devices. [Hatch et al.,2012] [Karnik et al.,2008] [Lahann et al.,2003] [Plouffe et al.,2009] [Vickers et al.,2012] Experimental data show that the mean cell density of samples is 10^6 cells/mL for the Lysed protocol. Therefore the sample should be diluted ten times after the protocol and the final volume processed would increase to 50 mL. Using this sample volume and a flow rate of $1.85 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$ in the inlet channel containing cells, the time required to process the sample volume in the device would be 7.5 hours. If less time was required, the flow rate and consequently the inlet velocity in the channel containing the cell suspension could be increased.

This work shows how to pretreat the human bone marrow sample in order to make it suitable to be inserted in a microfluidic device without altering MSCs properties. Then a possible geometry of the microfluidic device, that permits to isolate MSCs with the selective adhesion technique, has been developed and analysed.

Capitolo 1

Introduzione Generale

1.1 Ambito generale del lavoro di tesi

Questo elaborato di tesi si inserisce in un progetto di ricerca che prevede la collaborazione tra il Politecnico di Milano e l'Istituto Ortopedico Galeazzi di Milano per la realizzazione di un dispositivo microfluidico che selezioni le cellule staminali mesenchimali provenienti da midollo osseo tramite adesione selettiva.

Il lavoro svolto e descritto in questo elaborato si divide in una parte sperimentale, svolta nei laboratori di ricerca dell'Istituto Ortopedico Galeazzi e di una parte computazionale di progettazione effettuata al Politecnico di Milano, presso il LaBS (Laboratorio di Meccanica delle Strutture Biologiche).

La collaborazione con l'ospedale ha permesso di avere a disposizione per l'analisi sperimentale campioni di midollo osseo provenienti dallo scarto di operazioni chirurgiche in seguito a impianto di protesi d'anca.

1.2 Stato dell'arte

1.2.1 Cellule staminali mesenchimali

Medicina riparativa e cellule staminali

A fronte del continuo invecchiamento della popolazione, della carenza di organi utilizzabili per trapianti rispetto alla loro richiesta, dell'aumento delle prospettive di vita dell'uomo e dell'interesse nella possibilità di aumentare e facilitare la guarigione dei tessuti soggetti a traumi o degenerazioni, la medicina moderna ha dovuto evolversi ed estendersi verso nuovi orizzonti, sviluppando un diverso approccio nei confronti di traumi e malattie degenerative. Sotto la spinta di questa necessità si è sviluppata quella che attualmente viene chiamata medicina rigenerativa. In contrasto con la medicina tradizionale, basata sul contenimento della malattia mediante un approccio di sostituzione della funzione persa del tessuto con dispositivi artificiali permanenti piuttosto che su una vera e propria cura, la medicina rigenerativa si pone come obiettivo quello di riparare o sostituire tessuti e organi del corpo umano danneggiati dall'invecchiamento, da traumi, malattie o difetti congeniti (definizione ripresa da US National Institute of Health, 2006) e lo fa sfruttando la risposta biologica dell'organismo. Gli approcci della medicina rigenerativa sono essenzialmente tre: l'impiego di geni e proteine come terapia, terapie cellulari basate sulla diretta introduzione di cellule all'interno di specifiche strutture nel paziente o la creazione di organi o tessuti biologici, ovvero ciò che si intende per ingegneria tissutale. E' nell'ambito della medicina rigenerativa che le cellule staminali

assumono una particolare rilevanza, data la loro grande potenzialità rigenerativa. [Oreffo et al, 2005]

Una cellula staminale è una cellula in grado di generare sia cellule figlie identiche alla cellula madre, sia cellule figlie differenziate lungo uno o più linee cellulari. La potenzialità replicativa di queste cellule è molto elevata. A seconda della loro ‘potenza’ le cellule staminali possono essere unipotenti, se in grado di generare un solo tipo cellulare, pluripotenti se in grado di generare più tipi cellulari o totipotenti se in grado di generare tutti i tipi cellulari. Le cellule staminali possono essere isolate, manipolate e fatte differenziare in vitro. Esse possono essere espanse in coltura e purificate ad ogni passaggio per eliminare quelle differenziate. La capacità di espansione dipende dall’età della fonte che può essere adulta, fetale o embrionale. (Figura 1.2.1)

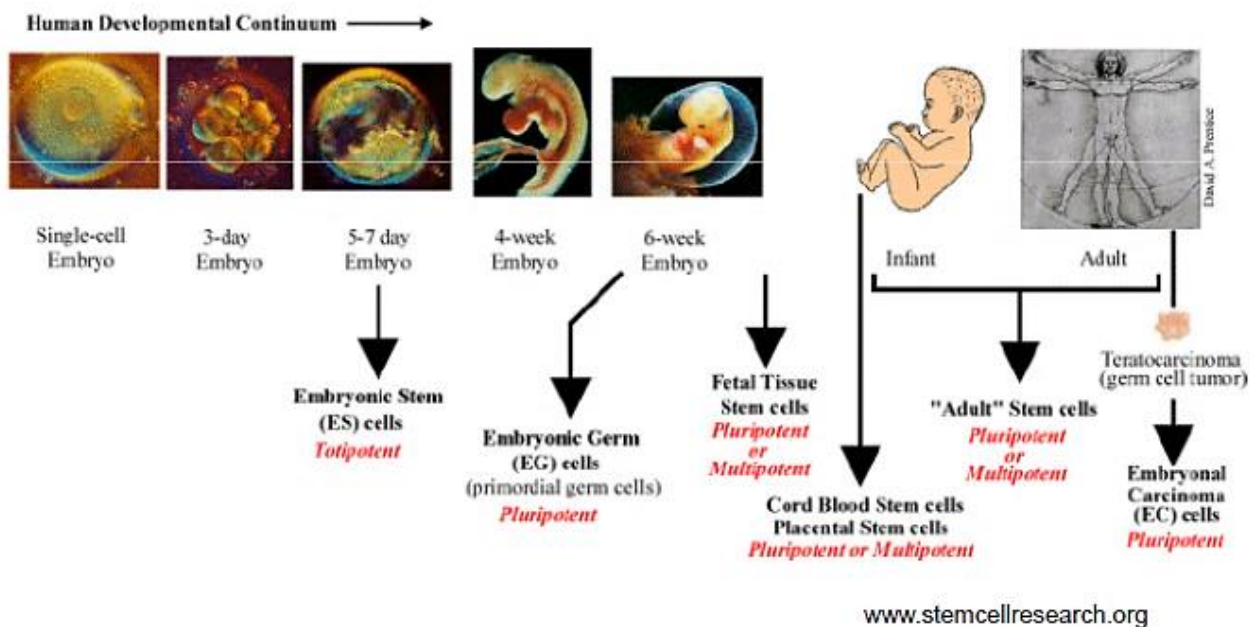


Figura 1.2.1 Fonti di cellule staminali [Tratta da www.stemcellresearch.org]

Tutti i tessuti umani sono popolati da cellule staminali pur avendo un diverso potenziale proliferativo, ovvero la capacità di riprodursi nel tempo.

Le cellule staminali possono essere suddivise in più linee: epiteliale, ematopoietica (Figura 1.2.2), mesenchimale (Figura 1.2.3), epatica e neuronale. I tessuti adulti che costituiscono la principale fonte di cellule staminali per l’ingegneria tissutale sono il midollo osseo (1 staminale/10⁵ cellule), il tessuto adiposo e il sangue periferico.

In particolare nel midollo osseo risiedono le linee staminali ematopoietica da cui di originano le cellule del sangue e mesenchimale, da cui si originano le cellule del tessuto osseo, cartilagineo, adiposo, muscolare, tendineo e dello stroma. [Mantero et al,2009]

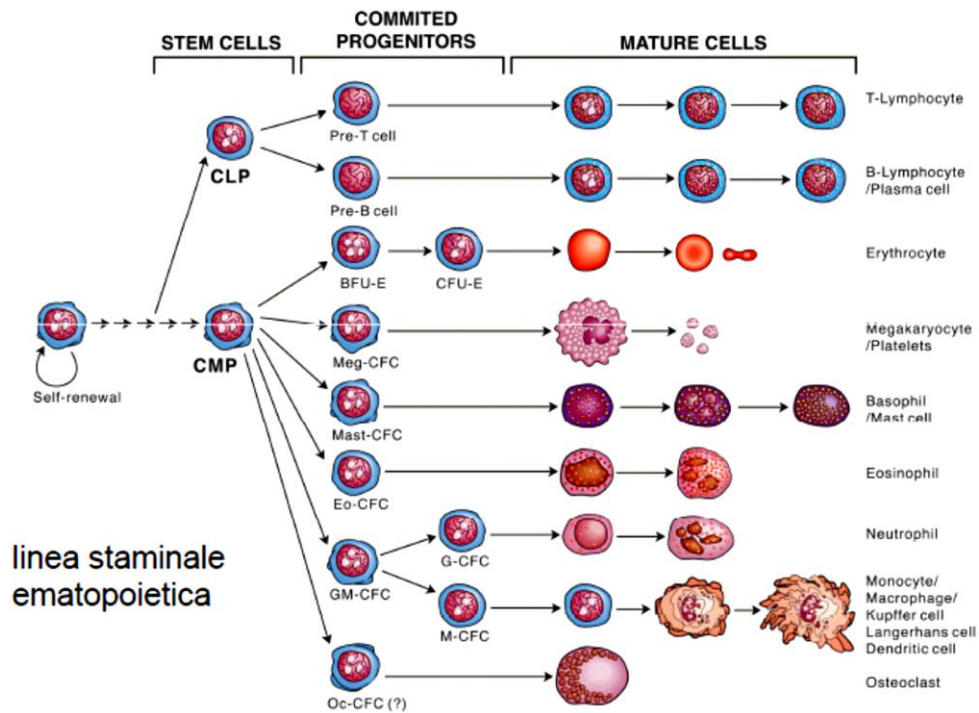


Figura 1.2.2 Linea staminale ematopoietica [Tratta dalle dispersive del corso di ingegneria Tissutale e Biomimetica, anno 2013-2014, Politecnico di Milano]

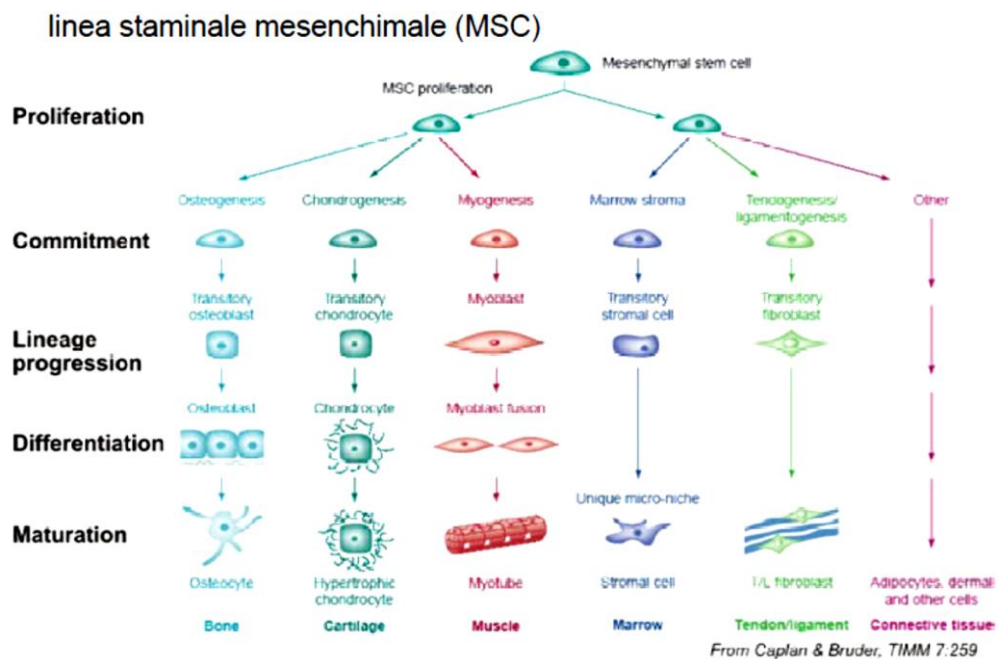


Figura 1.2.3 Linea staminale mesenchimale [Tratta dalle dispersive del corso di ingegneria Tissutale e Biomimetica, anno 2013-2014, Politecnico di Milano]

Cellule staminali mesenchimali

Il criterio comunemente accettato per definire una cellula mesenchimale è l'abilità che essa ha di formare tessuto osseo, cartilagineo e adiposo. [Pittenger et al.,1999] Parecchi studi hanno dimostrato che le cellule del midollo osseo possono essere piastrate in coltura e creare colonie di cellule derivanti da singole cellule mesenchimali. [Bianco et al.,2001] Queste colonie sono multipotenti e possono essere indotte a diventare in vitro osso, cartilagine o grasso per mezzo di semplici procedure di coltura. [Park et al.,1999] [Kuznetsov et al.,2001]

Per esempio incubando cellule MSCs (Mesenchymal Stem Cells) con un mezzo di coltura addizionato di acido ascorbico, beta-glicerofosfato e desametasone per 2-3 settimane è possibile indurre il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali in osteoblasti. Le cellule infatti creano aggregati o noduli e aumentano l'espressione della fosfatasi alcalina; nel tempo si notano depositi di calcio. Queste condizioni tuttavia non riflettono probabilmente i segnali fisiologici di cui risentono le cellule in vivo. [Park et al.,1999]

Il differenziamento adipogenico è invece indotto incubando le MSCs in mezzo di coltura contenete desametasone, insulina, isobutil-metilxantina e indometacina. Avviene un accumulo di vacuoli ricchi di grasso all'interno delle cellule che esprimono la proliferazione di perossisomi attivati dal recettore gamma2, la lipoproteina lipasi e la proteina aP2 che lega gli acidi grassi.[Pittenger et al.,1999]

Successivamente alla dimostrazione della possibile differenziazione delle MSCs in osso e grasso, è stato dimostrato che sotto particolari condizioni esse possono differenziarsi in vitro anche in condrociti, tenociti, miociti e cellule endoteliali.

Per indurre la differenziazione condrogenica le MSCs devono essere messe in colture in presenza del fattore di crescita TGF-beta. La colorazione con toluidina blu evidenzia l'abbondanza di glicosamminoglicani presenti nella matrice extracellulare. Le cellule sono in grado inoltre di produrre collagene di tipo II, tipico delle articolazioni cartilaginee.[Mackay et al.,1998].

La presenza di cellule staminali non ematopoietiche nel midollo osseo fu osservata per la prima volta dal patologo tedesco Cohnheim circa 135 anni fa. Egli dimostrò come il midollo osseo potesse essere una fonte di fibroblasti. Un grande contributo allo studio delle cellule mesenchimali fu in seguito dato da Friedenstein e colleghi. Essi piastrarono del midollo osseo su piastre e riuscirono a scartare le cellule ematopoietiche osservando che le cellule che aderivano avevano forma fusiforme, si aggregavano in gruppi da due a quattro cellule e che dopo alcuni giorni iniziavano a moltiplicarsi rapidamente. Dopo molti passaggi in coltura apparivano simili a fibroblasti e avevano la capacità di differenziare in colonie che assomigliavano a depositi di osso o cartilagine. Successivamente le osservazioni di Friedenstein furono portate avanti da altri gruppi negli anni 80' che stabilirono come

le cellule isolate fossero multipotenti e potessero differenziare in osteoblasti, condrociti, adipociti e anche mioblasti. Queste cellule furono chiamate cellule staminali mesenchimali (MSCs) o cellule stromali del midollo.[Chamberlain et al.,2007]

Le hMSCs (human MSCs) sono in genere isolate dal midollo osseo tramite separazione per gradiente per mezzo di centrifugazione. Possono essere messe in coltura in un mezzo col 10% di siero bovino e hanno la capacità di aderire su piastre, cosa che permette di scartare le cellule ematopoietiche che al contrario non aderiscono. Dopo una fase iniziale in coltura le MSCs iniziano a dividersi rapidamente, con un tempo di duplicazione che dipende dal donatore e dalla densità di piastratura iniziale. Cellule MSCs sono isolate non solo dal midollo osseo ma anche dal tessuto adiposo, dal fluido amniotico, dal periosteo e dal tessuto fetale e presentano caratteristiche eterogenee nel fenotipo. Cellule simili alle MSCs sono state isolate in tessuti patologici, quali articolazioni colpite da artriti reumatoidi e si ritiene che siano presenti in tutti gli organi e i tessuti sviluppati dopo la nascita. Inoltre MSCs sono state isolate in altre specie oltre a quella umana. [Chamberlain et al.,2007]

Le MSCs esprimono dei markers che non sono specifici, tuttavia un metodo per isolarle usato è quello della selezione per mezzo di anticorpi. Esse infatti non possiedono i marker delle cellule ematopoietiche.

Un vantaggio delle MSCs è che il loro fenotipo può essere definito come non immunogenico, caratteristica che permette il trapianto di queste cellule in un organismo ospite senza la necessità di immunosoppressori. Alcuni studi mostrano come le MSCs possano avere caratteristiche immunomodulatorie [Aggarwal et al.,2005] [Jiang et al.,2005] [Beyth et al.,2005] [Corcione et al.,2006], nello specifico come possano modulare molte delle funzione delle cellule-T inclusa l'attivazione cellulare [Bartholomew et al.,2002]. Nonostante ancora non siano chiari i meccanismi con i quali le MSCs esercitano i loro effetti immunosoppressivi, è possibile dire che le osservazioni in vitro effettuate possono essere ritrasportate in vivo [Chamberlain et al.,2007]

Studi e applicazioni delle cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali, grazie alle loro proprietà biologiche uniche e versatili, stanno suscitando negli ultimi anni un interesse sempre maggiore nel campo medico. Le loro caratteristiche antiinfiammatorie, antimicrobiche, antifibrotiche e rigenerative ne rendono la gamma di applicazioni davvero molto ampia, basti pensare che dal 2011 ci sono stati più di 200 trial clinici pubblicati che usano le MSCs, la maggior parte dei quali è in fase I o II di sperimentazione, solo una piccola parte è in fase III. Inoltre esistono molti altri studi che sono in fase preclinica. Questo testimonia il fatto che molto deve essere ancora studiato e scoperto riguardo queste cellule, ma che

le loro potenzialità sono enormi. I tessuti che possono essere trattati con le cellule staminali comprendono l'osso, la cartilagine, il polmone, il pancreas, il tessuto nervoso, il sistema circolatorio e gastrointestinale. Di seguito verranno riportate alcune delle applicazioni delle cellule staminali, che comprendono trial clinici per valutare l'efficacia dell'utilizzo di tali cellule. [Sutton et al.,2014][Farini et al.,2014][Murphy et al.,2013]

Ortopedia

Le cellule staminali mesenchimali secernono fattori in grado di promuovere la rigenerazione dell'osso e della cartilagine: questa caratteristica rende la loro applicazione molto promettente nel settore ortopedico. Uno studio preclinico [Shafiee et al.,2011] condotto ha dimostrato un miglioramento della guarigione di difetti cartilaginei in conigli trattati con cellule staminali mesenchimali. Altri studi hanno preso in considerazione l'utilizzo di graft contenenti cellule staminali mesenchimali per la cura di difetti ossei: è stato dimostrato che le mesenchimali poste nel sito di frattura sono in grado di differenziarsi in tessuto osseo e di promuovere l'angiogenesi[Granero et al.,2009]. MSCs iniettate *in vivo* nell'uomo, inoltre, si sono mostrate in grado di ridurre l'osteonecrosi dell'anca. [Scott et al.,2013]

Malattie neurologiche

Grazie alla loro versatilità è stato dimostrato che le cellule staminali mesenchimali sono in grado di differenziarsi in neuroni e astrociti e possono essere quindi utilizzate nella cura di malattie neurologiche [Pittenger et al.,1999]. Le MSCs, inoltre, promuovono l'autoriparazione e riducono formazione di cicatrici, poiché secernono stimoli che portano alla formazione di nuovi vasi, fattori neuroprotettivi e di crescita. In uno studio [Mazzini et al., 2003] pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (malattia che causa la degenerazione della funzionalità muscolare) sono stati trattati con iniezioni nel midollo spinale di cellule staminali mesenchimali fatte espandere in coltura. I controlli effettuati dopo il trattamento hanno dimostrato la sicurezza di tale trattamento. Inoltre anche nei casi di ictus o trauma si può considerare l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali per la riparazione del tessuto danneggiato, anche se in questo caso lo stress ossidativo causato dal trapianto potrebbe compromettere l'efficacia del trattamento. [Chao et al., 2009]

Cura di ferite

Il processo di guarigione di una ferita è un processo molto complesso e che se non avviene nel modo corretto può portare a fenomeni cronici che portano alla necessità di intervento chirurgico. Le cellule staminali, grazie alle loro proprietà antiinfiammatorie e angiogeniche, possono rappresentare

un valido aiuto in questi casi. Esse possono essere rilasciate nel sito della ferita direttamente (iniettate nella zona da trattare) o indirettamente (attraverso il sistema circolatorio). In alcuni studi realizzati è stato dimostrato che le cellule staminali sono in grado di accelerare i tempi di guarigione della ferita. [Stoff et al.,2009][Sorrell et al.,2009] Grazie alle proprietà antinfiammatorie e rigenerative, inoltre, le MSCs sono state utilizzate anche per la cura di ustioni e ulcere.[Guan et al.,2013]

Malattie Cardiovascolari

E' stato osservato *in vitro* che le cellule staminali mesenchimali sono in grado di differenziarsi in cardiomiociti. Partendo da questa evidenza le MSCs sono state usate per il riparo cardiovascolare. In un modello di roditori[Nagaya et al.,2005] innesti di cellule staminali hanno parzialmente riparato i cuori degli animali affetti da infarto miocardico, aumentato la densità capillare e diminuito il volume di collagene e di fibrosi. Questo tipo di trattamento è arrivato ad essere sperimentato anche sull'uomo[Katritsis et al.,2005]: 11 pazienti affetti da infarto sono stati trattati con MSCs autologhe e dopo il trattamento hanno mostrato un aumento della contrattilità miocardica. In particolare si ritiene che le citochine che derivano dalle MSCs siano in grado di inibire l'apoptosi dei cardiomiociti, permettendo quindi la formazione di nuovi vasi nel tessuto danneggiato.[Takahashi et al.,2006]

Malattie al fegato

Iniezioni di MSCs in ratti affetti da disfunzione epatica fulminante hanno portato a una proliferazione degli epatociti e una drastica diminuzione della morte delle cellule epatiche [Van Poll et al.,2008]. Per quanto riguarda l'uomo quattro pazienti sofferenti di cirrosi epatica sono stati trattati con MSCs autologhe e dopo le iniezioni è stato riportato un loro miglioramento della qualità della vita. [Mohamadnejad et al.,2007].

Malattie del tessuto polmonare

La capacità rigenerativa delle cellule staminali mesenchimali può essere utilizzata anche per curare le infiammazioni e le aree danneggiate del tessuto polmonare. In diversi studi è stato dimostrato che il trattamento con MSCs riduce il deposito di collagene nelle zone infiammate, inoltre le MSCs si sono dimostrate in grado di differenziare in cellule del tessuto epiteliale, riducendo ulteriormente l'infiammazione. [Tzouvelekis et al.,2011][Nueringer et al.,2006]

Il potere antiinfiammatorio e di promozione dei meccanismi di crescita di tessuto delle MSCs potrebbe essere sfruttato nella cura dell'asma, malattia cronica che causa l'infiammazione e la

reattività delle vie aeree. Modelli murini asmatici sono stati trattati con MSCs ed è emersa una significativa diminuzione della iper-reattività delle vie aeree e un abbassamento dei livelli di eosinofili nel fluido broncheoalveolare (sintomo della diminuzione dell'inflammazione) [Weiss et al.,2008].

Un'altra applicazione in studio delle MSCs riguarda la fibrosi cistica. Essa è una malattia genetica ereditaria mortale causata dalla mutazione di un gene, che ha impatto nel funzionamento degli organi del corpo e, in particolare, comporta l'incapacità di controllare le infiammazioni e le infezioni polmonari. Grazie alle loro proprietà antiinfiammatorie e antimicrobiche le MSCs possono rappresentare un valido aiuto nella cura della malattia. Uno studio su topi ha dimostrato che il trattamento terapeutico con MSCs porta a una diminuzione della severità del profilo infiammatorio in animali affetti da fibrosi cistica[Bonfield et al.,2013].

Diabete

La possibile applicazione delle MSCs nella cura del diabete nasce dall'osservazione *in vitro* che le MSCs sono in grado di differenziare anche in cellule in grado di produrre insulina in base ai livelli di glucosio [Zulewski et al., 2001]. Sebbene ancora molti studi debbano approfondire il possibile ruolo delle MSCs nella cura del diabete di tipo I questa osservazione ne suggerisce una loro futura applicazione clinica anche in questo campo.

Le cellule staminali mesenchimali, quindi, hanno un futuro molto promettente in molte applicazioni mediche e in particolare nella medicina rigenerativa. Attualmente sono in studio molti trial clinici per accertare le loro abilità nella cura di malattie e il loro potenziale utilizzo. L'applicazione in clinica delle MSCs è sicuramente una delle frontiere più innovative della medicina.

1.2.2 La microfluidica

Definizione e cenni storici

La microfluidica è la scienza e l'insieme di tecnologie in grado di trattare piccole quantità di fluido ($10^{-6}/10^{-10}$ litri) usando canali di dimensioni che vanno dalle decine alle centinaia di micrometri. I vantaggi di questa tecnologia sono quelli poter di trattare piccole quantità di campione e di reagente e di poter selezionare particelle di dimensioni molto piccole con grande risoluzione e sensibilità, basso costo, tempi di analisi limitati. I campi storicamente legati alla microfluidica sono quattro: l'analisi molecolare, la difesa biologica, la biologia molecolare e la microelettronica. Le origini della microfluidica risalgono, in particolare, alle microanalisi (cromatografia a fase-gassosa, cromatografia liquida ad alta pressione ed elettroforesi capillare), che permettono di avere alta

risoluzione utilizzando un piccolo volume di campione. Una grande spinta alla crescita della tecnologia microfluidica fu data alla fine della Guerra Fredda, con l'avvento delle minacce chimiche e biologiche: il dipartimento della difesa statunitense, infatti, alla fine degli anni '90 sostenne una serie di programmi per lo sviluppo di dispositivi di microfluidica in grado di identificare la presenza di tali minacce. Il terzo campo, quello della biologia molecolare, si sviluppa intorno agli anni '80 e la microfluidica risponde alle richieste di avere un metodo molto sensibile e ad alta risoluzione, ma che lavori su piccolissime quantità. Infine il contributo della microelettronica deriva dal fatto che si notò come la tecnica della fotolitografia, che aveva avuto grande successo nella microelettronica al silicio, potesse essere applicata anche alla microfluidica. I primi dispositivi microfluidici erano infatti realizzati in silicio e vetro. Oggi alla fotolitografia è associata la soft-litography, per la realizzazione di chip in materiali polimerici, più economici, versatili e con proprietà più appropriate per l'utilizzo anche in campo biologico e con le cellule. [Whitesides et al.,2006]

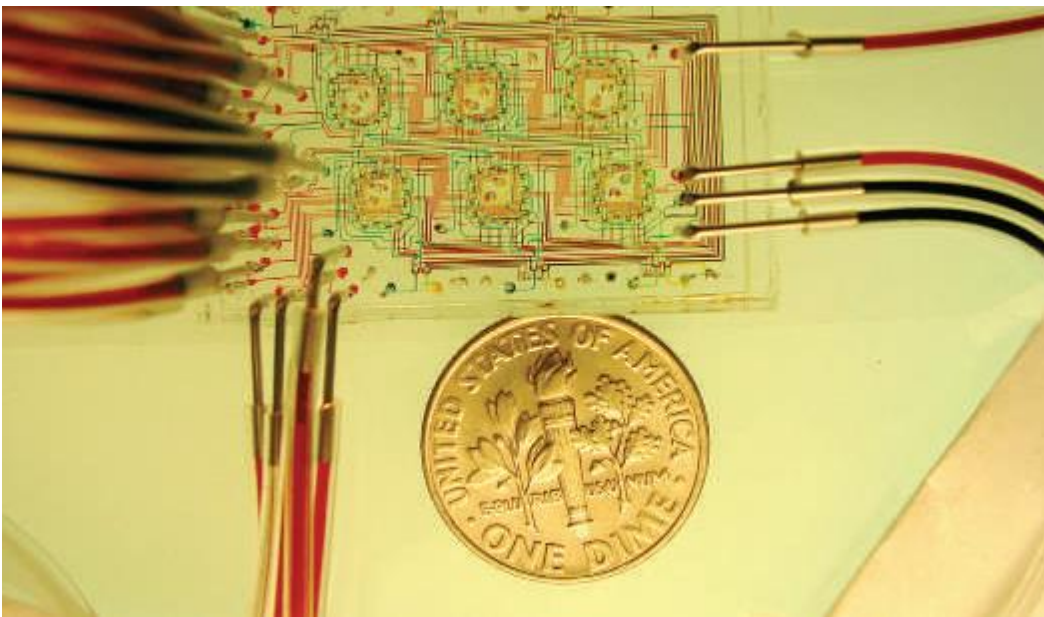


Figura 1.2.4 Dispositivo microfluidico utilizzato per studi su cellule procariote. [Whitesides, 2006]

Caratteristiche principali dei dispositivi microfluidici

Il regime di moto presente nei dispositivi microfluidici è solitamente laminare con un valore del numero di Reynolds (che rappresenta il rapporto tra le forze convettive e quelle viscosive) intorno all'unità. Ciò implica che i fenomeni viscosi hanno maggior peso dei fenomeni convettivi: i filetti fluidi scorrono paralleli. L'unico mescolamento possibile è dato dalla diffusione molecolare nell'interfaccia tra i due fluidi. Il fatto che il flusso sia laminare può essere utile in certe applicazioni, ma svantaggioso in altre. Per questo motivo sono state implementate una serie di

strategie volte a ottenere un veloce miscelamento delle soluzioni. Esempi sono l'ottimizzazione del contatto di interfaccia tra i filetti per favorire una migliore diffusione, oppure la creazione di geometrie che inducono moti caotici.

Un dispositivo di microfluidica è caratterizzato dai seguenti componenti: un sistema di introduzione/estrazione del campione attraverso siringhe o tubi, un sistema per far muovere il fluido nel chip e se necessario eventualmente rimescolare e infine all'occorrenza dispositivi specifici dell'applicazione (ad esempio detector, componenti per la purificazione del campione).

Le forze che permettono al fluido di scorrere nel dispositivo possono avere diversa natura e vanno dal gradiente di pressione, ai campi elettrici e magnetici, alla capillarità, alle forze centrifughe, ai flussi acustici.

Il metodo più utilizzato in microfluidica per indurre un flusso è basato sull'applicazione di un gradiente di pressione. Il flusso generato si può descrivere con la legge di Poiseuille e dipende dal gradiente di pressione applicato, dalla geometria del canale (raggio e lunghezza) e dalla viscosità della soluzione. Il flusso risultante ha un profilo parabolico. Flussi guidati da gradiente di pressione possono essere generati da pompe esterne connesse al dispositivo microfluidico, tuttavia l'obiettivo più ambito sarebbe quello di integrare e miniaturizzare tutti i componenti all'interno del chip. A tal fine si sono implementate pompe e valvole che utilizzano membrane deformabili per creare e controllare flussi pulsatili. [Fiorini et al.,2005]

Applicazioni microfluidiche

I campi di applicazione della microfluidica sono svariati e in continuo aumento ed evoluzione nel tempo. In particolare l'interesse nel settore di ricerca della progettazione di dispositivi che integrano funzioni multiple in un unico chip (Micro Total Analysis System (μ TAS) o Lab-On-Chip (LOC)) è cresciuto enormemente in questi anni come dimostrato dal numero sempre crescente di articoli scientifici correlati all'argomento e dal numero di aziende che si occupano della produzione di tali dispositivi.

Esempi concreti di applicazioni presenti in letteratura sono:

- La cristallizzazione delle proteine poiché i dispositivi di microfluidica consentono la generazione contemporanea di un gran numero di diverse condizioni di cristallizzazione (temperatura, pH, umidità, etc) all'interno dello stesso chip
- Analisi biochimiche
- L'utilizzo nei campi di screening di sostanze e microreattori chimici

- La separazione, la purificazione, l'isolamento e la selezione dei campioni. (Elettroforesi; separazione di cellule; cromatografia) [Ohno et al.,2008]
- Nelle reazioni chimiche e enzimatiche: l'uso della microfluidica aumenta l'efficienza dei processi di scoperta di nuovi farmaci in particolare quelli che coinvolgono le reazioni tra tre fasi grazie alla grande area di interfaccia per volume di particolari microcanali [Kobayashi et al.,2004]
- L'immunodosaggio: test biochimici che catturano le molecole di interesse (ormoni biomarkers, etc) da una matrice. [Christodoulides et al.,2005]
- L'analisi del DNA [Liu et al.,2007]
- La realizzazione in laboratorio di test medici attraverso i chip
- L'uso nella biologia cellulare: i microcanali hanno le dimensioni caratteristiche delle cellule e questo rende possibile la manipolazione a livello della singola cellula e il rapido scambio di sostanze

I motivi per cui i dispositivi microfluidici dimostrano di essere particolarmente interessanti nel campo dello studio del comportamento cellulare sono:

- Un sempre maggior interesse nello studio dell'effetto di farmaci, stimoli esterni e comportamento sulle singole cellule
- La possibilità di integrare una serie di comuni operazioni di analisi in un unico sistema
- Il possibile utilizzo simultaneo di molti metodi di manipolazione di un grande numero di cellule
- L'adattabilità dei dispositivi microfluidici alla dimensione cellulare (10-100 μm)
- La possibilità di manipolare e gestire singoli oggetti dalle dimensioni cellulari da parte dei dispositivi micromeccanici
- La possibilità di creare forti campi elettrici con piccoli valori di voltaggio in geometrie di piccole dimensioni
- La rapidità degli scambi di calore e di massa dovuti alle distanze ridotte.

Lo sviluppo di sistemi microfluidici associato all'analisi di sistemi che contengono cellule viventi può essere diviso in quattro campi principali:

- Il campionamento cellulare, volto a sviluppare metodi sempre meno invasivi per estrarre campioni biologici
- La cattura e la separazione cellulare, che ha l'obiettivo di riuscire a manipolare e separare particelle e che al suo interno vanta una moltitudine di metodologie quali metodi di

separazione ottiche, a fluorescenza o magnetici, metodi meccanici quali la centrifugazione o la filtrazione del campione, metodi di separazione basati su campi elettrici.

- Il trattamento delle cellule all'interno del dispositivo microfluidico, volto a favorire una successiva analisi, come ad esempio le tecniche di lisi cellulare, trasfezione genica e fusione cellulare
- L'analisi cellulare che include lo studio del trasporto e delle colture cellulari, della loro caratterizzazione elettrica e la possibilità di effettuare specifiche analisi su ristretti campioni cellulari

[Andersson et al.,2003]

A fronte degli innumerevoli vantaggi uno dei limiti dell'utilizzo della microfluidica è il fatto che i campioni biologici, in particolare quelli provenienti dalla clinica, hanno bisogno di un pretrattamento prima di poter essere inseriti nel dispositivo (oppure di un pretrattamento integrato nel dispositivo).

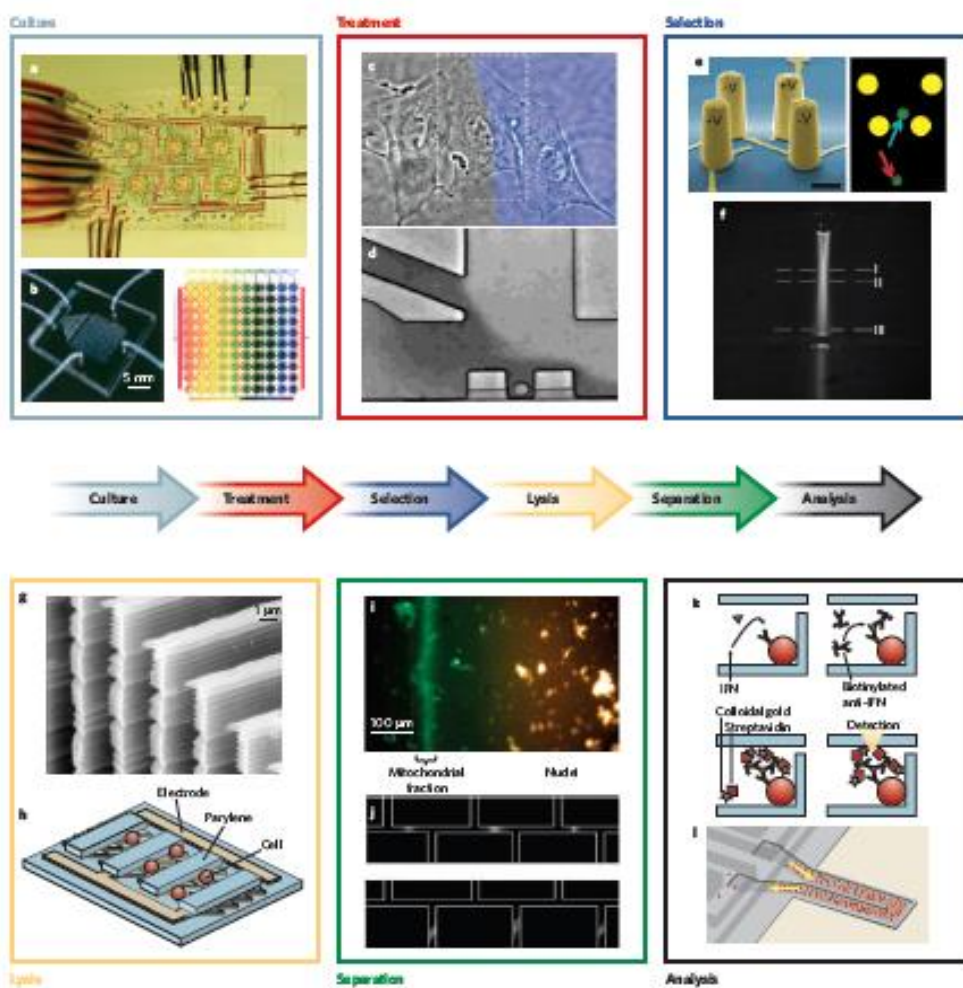


Figura 1.2.5 Microsistemi che consentono test cellulari dalla coltura all'analisi biochimica. a, l'immagine mostra sei bioreattori che operano in parallelo su un chip; b, dispositivo microfluidico con integrato un generatore di gradiente; c, due flussi laminari

espongono una singola cellula a diverse condizioni; d, perfusione di una singola cellula intrappolata; e, elettroforesi su singola cellula; f, citometria a microflusso; g, microdispositivo con protrusioni a lama; h, dispositivo con microelettrodi integrati per lalisi; i, focusing isoelettrico di organuli cellulari; j, separazione bidimensionale di proteine; k, immunodosaggio eseguito tramite microbiglie; l, sensore di massa per analisi. [El-Ali et al., 2006]

Tecniche di fabbricazione

I dispositivi microfluidici possono essere fabbricati con un'ampia gamma di metodi. Come regola generale il metodo di fabbricazione scelto è determinato da una serie di fattori quali la tecnologia e l'attrezzatura a disposizione, i costi, la velocità di produzione, le capacità produttive e il materiale che si vuole utilizzare come substrato.

A causa delle loro dimensioni i dispositivi di microfluidica vengono fabbricati usando tecniche prese dal campo dell'industria dei semiconduttori e delle materie plastiche, come le lavorazioni micromeccaniche, la foto-litografia, la replica molding, l'embossing e l'injection molding.

Nella maggior parte dei casi un dispositivo di microfluidica consiste in microcanali stampati in un polimero, chiusi da una superficie piatta (generalmente di vetro). Il polimero più usato è il polidimetilsilossano (PDMS) che ha il vantaggio di essere trasparente, biocompatibile (quindi adatto all'utilizzo con sostanze biologiche), poco costoso e di legarsi facilmente con il vetro. Inoltre una delle tecniche più utilizzate per la realizzazione di chip di microfluidica in PDMS è la soft-lithography, tecnica semplice, efficace e veloce (tipicamente possono passare anche meno di 2 giorni dal design alla fabbricazione del dispositivo funzionante). Tale tecnica prevede che una volta definito il design del microcanale, ne venga realizzato il negativo che servirà da stampo; a questo scopo uno strato di resina (photoresist) viene distribuito su una superficie piatta con un certo spessore prestabilito, viene inserita una maschera per proteggere parti della resina in modo tale da esporre in modo selettivo le aree che rappresenteranno i microcanali del dispositivo ai raggi UV, che permettono lo sviluppo del photoresist. Successivamente il photoresist viene trattato con un solvente che scioglie le parti di resina che sono state esposte ai raggi UV nel caso di photoresist positivo o che scioglie la parte non esposta nel caso di photoresist negativo: in questo modo si ottiene uno stampo di resina per la replica dei microcanali, dove l'altezza di tali canali è determinata dallo spessore iniziale della resina. Dopodiché una miscela di PDMS liquido unito a un agente reticolante viene inserita nello stampo in resina e il tutto viene introdotto in un forno. Una volta reticolato il PDMS può essere estratto dallo stampo: si ottiene così il microcanale nel blocco di PDMS. In corrispondenza dell'ingresso e dell'uscita vengono poi realizzati dei fori per permetterne il collegamento con i tubi che trasportano il fluido. L'ultimo step prevede che la superficie del PDMS venga trattata con plasma per attivare i legami covalenti che permetteranno un'adesione robusta e permanente alla superficie del vetro.

[Fiorini et al.,2005][Whitesides et al.,2007]

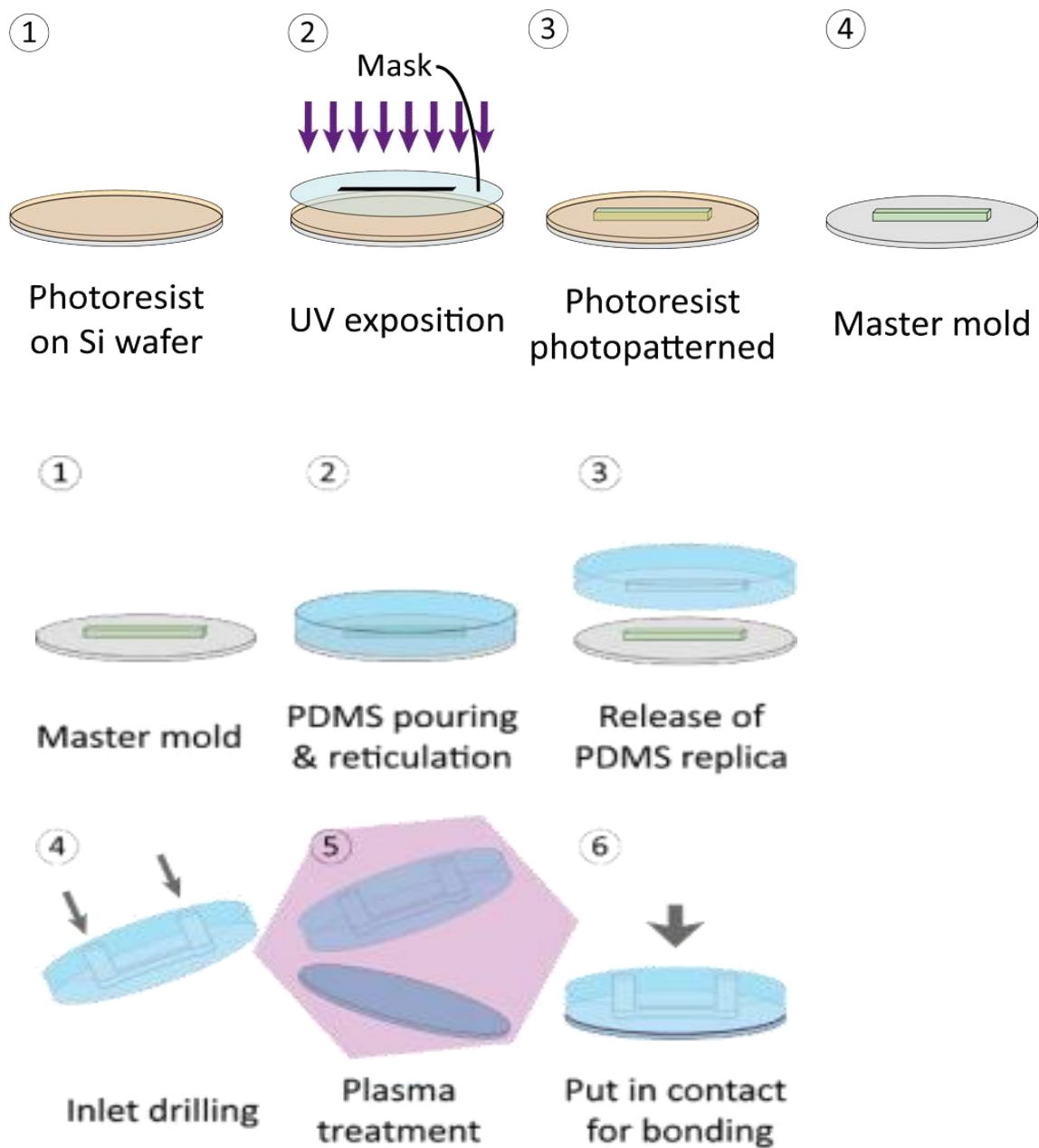


Figura 1.2.6 Sequenza di passaggi per la realizzazione di un semplice dispositivo di microfluidica. [Tratto da www.elveflow.com]

1.2.3 Tecniche di separazione

Le cellule staminali mesenchimali sono presenti come piccola frazione della componente cellulare di molti tessuti, tra cui il midollo osseo. Per poter utilizzare tali cellule è necessario, quindi, effettuare un processo di separazione dalla restante componente cellulare. Per questo motivo sono state sviluppate una serie di tecniche di separazione, basate su diversi principi. I parametri per

valutare la bontà della tecnica sono principalmente l'efficienza e la purezza. Per efficienza si intende il rapporto tra il numero di cellule catturate e il numero di cellule staminali presenti nel campione; un'efficienza superiore all'80% è ritenuta accettabile. La purezza, invece, è il rapporto tra il numero di cellule effettivamente staminali e il numero di cellule totali catturate.

1.2.3.1 Metodi tradizionali di separazione

I metodi standard utilizzati per la separazione di cellule staminali dal resto del campione si dividono in tre principali tipologie:

1. Tecniche di adesione statica.

Queste tecniche si basano sul fatto che le cellule staminali mesenchimali a differenza delle altre cellule tendono ad aderire al fondo della piastra di coltura, opportunamente trattato. Questo metodo è utilizzato per isolare le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo e le cellule staminali derivanti dall'adipe umano dal tessuto rimosso durante la liposuzione. La purezza è limitata dal fatto che anche cellule non staminali vanno ad aderire al fondo della piastra. Questo limite viene in parte risolto tramite l'utilizzo di particolari mezzi di coltura che permettono di favorire la proliferazione delle cellule staminali rispetto alle altre. Dopo l'espansione il campione risulta effettivamente ricco di cellule staminali.

2. Tecniche di separazione basate su parametri fisici (dimensione/densità).

Queste tecniche sfruttano il fatto che le staminali hanno dimensione e densità diversa dalle altre cellule del tessuto. Il limite principale di tale tecnica è la bassa purezza del campione che si ottiene dovuta al fatto che la densità e le dimensioni tra le cellule staminali e le altre non sempre sono così marcate. Alcuni esempi di metodi di separazione basati su parametri fisici sono:

- Centrifugazione per gradiente di densità. Quando sono sottoposte a forza centrifuga le cellule si muovono secondo il gradiente di densità e si posizionano in base al rapporto tra la densità del mezzo e quella delle cellule. In questo modo le cellule staminali possono essere separate dal resto della soluzione. La tecnica è semplice, ma la purezza non è molto alta.
- Field flow fractionation (FFF). Questo metodo sottopone le cellule a forze inerziali e non inerziali, in modo tale che esse si muovano in base alla morfologia e alla dimensione verso un collettore, a diversi intervalli di tempo; in questo modo il FFF permette di isolare le cellule staminali (che hanno dimensione e morfologia diverse dalle altre cellule).
- Dielettroforesi. Si tratta di un metodo di selezione basato sulle proprietà elettrofisiche delle cellule. Una cellula inserita in un campo elettrico, infatti, si polarizza e crea un dipolo. Se il

campo elettrico è non uniforme si crea una forza netta che causa il movimento della cellula in base alle sue dimensioni, alla sua carica superficiale e al contenuto di acido nucleico. Questa tecnica presenta dei limiti soprattutto nella purificazione del campione, che spesso anche dopo il trattamento risulta contaminato da cellule non staminali.

3. Tecniche basate su affinità.

Queste tecniche sfruttano l'accoppiamento chimico, elettrico o magnetico e prevedono l'utilizzo di anticorpi per marcare la superficie della cellula staminale. Esempi di tali tecniche sono:

- Fluorescence-activated cell sorting (FACS). Questo metodo di separazione utilizza un anticorpo che va a marcare le cellule staminali con una molecola fluorescente e permette così di dividerle dalle altre attraverso l'utilizzo della fluorescenza. Il FACS permette di ottenere una purezza molto alta (oltre 95 %), ma a fronte di un alto costo e tempi di trattamento lunghi (10^7 cellule/ora).
- Magnet-activated cell sorting (MACS). Questa tecnica prevede l'incubazione del campione cellulare in soluzione con anticorpi e biglie magnetiche, usate al posto delle molecole fluorescenti. Applicando un campo magnetico vengono isolate le biglie magnetiche che hanno selezionato le cellule target di riferimento. Il MACS permette una separazione più rapida del FACS (10^{11} cellule/ora), ma la purezza si abbassa a circa il 75 %.

[Zhu et al.,2013]

1.2.3.2 Nuovi metodi di separazione in sviluppo

Per superare i limiti delle tecniche in commercio e per avere una maggiore purezza nella separazione, una migliore semplicità nella preparazione del campione e per poter trattare volumi maggiore di campione si stanno sviluppando nuove tecniche, anche se spesso in realtà si tratta di miglioramenti di tecniche già esistenti. Di seguito vengono citate e brevemente spiegate tali tecniche che sembrano essere promettenti per il futuro.

- Sviluppo di superfici modificate per il controllo selettivo dell'adesione cellulare.
Questa tecnica intende controllare l'adesione selettiva delle cellule alla piastra di coltura modificando il substrato sul quale le cellule aderiscono. Inoltre ha come obiettivo quello di controllare la successiva morfologia e risposta cellulare del campione piastrato. E' noto dalla letteratura, infatti, che il fenotipo di una MSC generica può essere influenzato

controllando le proprietà fisiche e chimiche del materiale sul quale vengono poste le cellule. Sono stati perciò sviluppati vari metodi di modifica fisica che includono il controllo della rigidità, scabrosità, topografia e nanotopografia del materiale su cui le cellule aderiscono e di modifica chimica che includono il controllo del legame di gruppi funzionali specifici, proteine, fattori di crescita e peptidi in superficie al fine di indurre una risposta cellulare specifica. Tuttavia la riproducibilità e l'efficienza di questi metodi è bassa e ne risulta uno sviluppo di una popolazione molto eterogenea di cellule. I criteri esistenti utilizzati per definire e guidare le MSCs, inoltre, non sono in grado di identificare se un cellula staminale mesenchimale multipotente provenga da una cellula progenitrice o da una cellula di limitata plasticità. Perciò i materiali di substrato dovrebbero essere concepiti in modo da avere proprietà selettive, che migliorino l'adesione cellulare o in modo da riuscire a controllare l'iniziale adesione delle sole cellule di interesse. È stato provato in letteratura che le cellule siano sensibili a stimoli a livello nanometrico, pertanto è necessario progettare superfici che riescano a fornire un controllo dalla nano-scala in avanti. Un esempio di tecnologia utilizzata per creare modifiche superficiali nanometriche e pattern specifici è la Dip Pen Nanolithography. È stato dimostrato che superfici modificate chimicamente a livello nanometrico in modo da avere gruppi funzionali metile hanno la capacità di migliorare l'abilità del substrato di far aderire il fenotipo delle MSCs. L'efficacia delle modifiche superficiali di inserimento di gruppi funzionali $-CH_3$ al substrato nel fare aderire le MSCs dipende, in particolare, dalla lunghezza delle catene radicaliche inserite nella modifica superficiale e dal grado di legame presente tra i gruppi $-CH_3$ e la base del substrato. Valutando il rilascio del fattore FGF, l'espressione di alcuni marker specifici e l'adesione cellulare è possibile valutare quale sia la modifica superficiale più adatta a favorire l'adesione e la proliferazione di un gruppo omogeneo di MSC. Studi hanno dimostrato che l'inserimento di catene contenenti gruppi metile con tecniche di rivestimento delle superfici che sfruttano il silicio per legare il substrato risulta essere una valida alternativa al rivestimento delle superfici con fibronectina e gruppi RGD, solitamente usati come rivestimento del substrato.[Curran et al.,2011]

- Metodo che utilizza polimeri termosensibili: poliN-isopropilmetacrilammide (PNIPAAm)
Questo polimero ha la caratteristica di essere solubile in acqua a temperatura ambiente ma di precipitare nelle soluzioni acquose a 35 °C. Il PNIPAAm viene coniugato con anticorpi che riconoscono le cellule staminali, le catturano e dopodiché cambiando temperatura da 20 a 35 °C PNIPAAm e staminali catturate precipitano nella soluzione acquosa. Il precipitato viene poi separato dal resto tramite centrifugazione per gradiente di densità tra due fasi. Questo

metodo è semplice veloce e può essere applicato per separazioni su larga scala, ma la purezza che se ne ricava deve ancora essere migliorata soprattutto per le applicazioni reali dove il numero di staminali è una piccolissima parte della popolazione cellulare. [Zhu et al.,2013]

- Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)

Questo metodo utilizza brevi sequenze di acidi nucleici (aptameri) che sono in grado di legarsi alle cellule in modo selettivo. Inizialmente la popolazione di cellule viene incubata con aptameri e dopo l'incubazione gli aptameri che non si sono legati con le cellule vengono rimossi. Successivamente anche gli aptameri legati vengono rilasciati dalla superficie delle cellule staminali e viene iniziata una nuova incubazione di aptameri e staminali. Il continuo rilascio e la successiva cattura crea una popolazione di aptameri con alta affinità per le staminali. Il vantaggio è che questa tecnica utilizza aptameri al posto dei tradizionali anticorpi che hanno un costo elevato e che è in grado di catturare anche i markers non proteici sulle cellule staminali. Il metodo SELEX richiede processi per la selezione e l'amplificazione degli aptameri e ha come limite il fatto che a volte la specificità del legame aptamero-cellula staminale è insufficiente e non permette di avere un'alta purezza. Inoltre la quantità di campione processabile è ridotta. [Zhu et al.,2013]

1.2.3.3 Microfluidica

Molti dei metodi citati, come le tecniche di separazione basate su differenza di dimensione e densità delle particelle o basate su affinità, possono essere applicati alla microfluidica. La microfluidica presenta il vantaggio di consumare meno campione e reagenti rispetto ai metodi tradizionali e l'operazione di selezione e raccolta delle staminali può essere svolta in continuo e su un unico chip. Inoltre le operazioni possono essere automatiche e richiedere meno tempo agli operatori. Il limite sta nella difficoltà ad applicare le tecniche di microfluidica a grandi volumi di campione, anche se esistono dispositivi con grandi aree superficiali, flussi elevati e in parallelo.

Le tecniche di separazione cellulare associate alla microfluidica sono numerose, ma possono essere divise in due categorie principali: tecniche attive e passive. Le tecniche attive sfruttano la presenza di una forza esterna che può essere di tipo elettrico, magnetico, ottico o acustico. Esempi di metodi attivi sono la citometria di flusso (FACS), l'elettroforesi e la dielettroforesi. Le tecniche passive invece funzionano in base alla geometria del dispositivo e alle forze idrodinamiche associate. [Bhagat et al.,2010] In particolare molte di queste tecniche, che verranno in seguito illustrate tramite esempi trovati in letteratura, consentono la selezione di cellule staminali sfruttando le differenze di dimensioni tra le cellule staminali e le altre cellule. Un'altra tecnica di separazione

sempre più in rapida crescita sfrutta la copertura di parti del dispositivo microfluidico con aptameri o proteine specifiche che consentono l'adesione e quindi la selezione di cellule specifiche.

Esempi di tecniche microfluidiche di separazione in base alla dimensione del campione cellulare

- Pinched flow fractionation [Yamada et al.,2004]

Questo tipo di dispositivo prevede la presenza di due ingressi attraverso cui vengono immessi un liquido contenente cellule e un liquido privo di cellule. Nel ramo di unione (pinched segment) le particelle si allineano vicino alla parete. (Figura 1.2.7) Percorso un breve tragitto il ramo si amplia e questo comporta che le particelle più grosse risentano di una forza diretta verso il centro del canale, mentre le particelle più piccole risentano di una forza diretta verso la parete. Quindi la leggera differenza di posizione, che c'era già nel ramo stretto, viene amplificata e sfruttata per separare cellule di diverse dimensioni. Diversi fattori influenzano la separazione: il rapporto tra le portate all'ingresso (la larghezza del ramo contenente fluido con particelle deve essere più piccola del diametro della particella più piccola per avere buon allineamento che consente una miglior separazione), la larghezza del segmento pinched (per una migliore separazione occorre una larghezza più piccola possibile che però non deve creare intasamenti), l'angolo tra i due rami (un angolo di 60° crea una minore differenza di posizione tra particelle con diverso diametro rispetto a un angolo di 180°). Il flusso totale, invece, non influenza in maniera rilevante la tecnica di separazione.

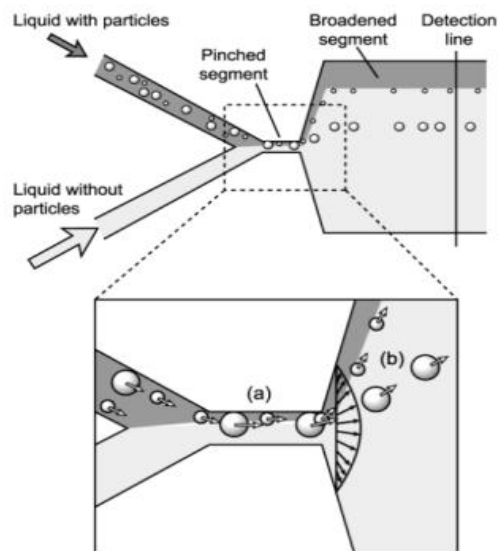


Figura 1.2.7 Principio del PFF (Pinched Flow Fractionation). (a) Nel canale di pinched, le particelle sono allineate verso una parete a seconda della loro dimensione mediante il controllo delle portate in ingresso. (b) Le particelle sono separate in base alla loro dimensione dall'ampliamento del profilo di flusso che avviene alla fine del canale di pinched. Il liquido contenente le particelle è colorato in grigio in figura. [Yamada et al.,2004]

- Picked flow fractionation con rami asimmetrici [Takagi et al.,2005]

La tecnica tradizionale del Pinched Flow Fractionation non riesce a separare bene le particelle che hanno diametro molto più piccolo della larghezza del canale pinched e questa larghezza non può essere troppo ridotta per motivi di fabbricazione e di occlusione con contaminanti. Questo problema può essere risolto mettendo dopo il canale pinched dei rami con geometria asimmetrica. Controllando la larghezza e la lunghezza dei rami si può avere lo stesso effetto che dà il restringimento del canale pinched senza incorrere in problemi di occlusione. E' stato dimostrato che in questo modo si riescono a separare particelle con dimensioni di un ordine di grandezza inferiore rispetto alla tecnica tradizionale. Il controllo della geometria dei rami permette una migliore separazione, con una maggior risoluzione. (Figura 1.2.8)

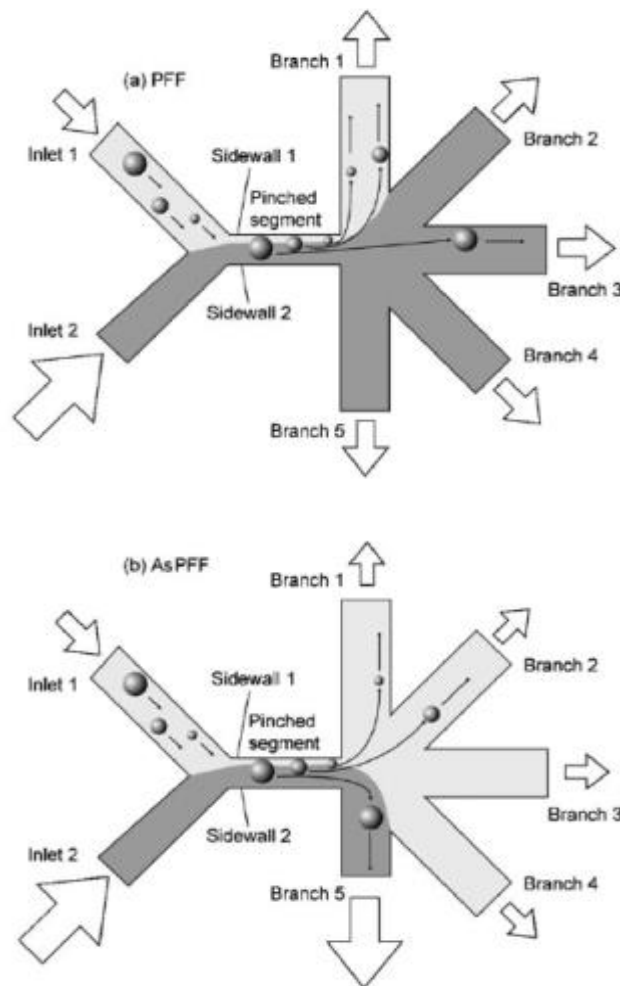


Figura 1.2.8 Diagramma schematico che illustra la separazione delle particelle: (a) PFF tradizionale, (b) PFF asimmetrica. Il liquido contenente particelle è segnalato in figura dal colore grigio. La dimensione delle frecce è direttamente proporzionale alla portata presente nei rami. Nella PFF tradizionale i rami sono tutti identici e il flusso di liquido nel ramo di pinched è uniformemente distribuito. Pertanto i rami 4 e 5 non vengono mai usati e la differenza nella posizione delle particelle è piccola. Nella PFF asimmetrica è presente un canale (drain channel) più corto o più largo degli altri e il flusso si distribuisce in modo asimmetrico. In questo modo tutti i rami vengono utilizzati e la differenza tra la posizione che le particelle assumono a seconda della loro dimensione diventa maggiore. [Takagi et al.,2005]

- Filtrazione idrodinamica [Yamada et al., 2005]

Questo metodo sfrutta il fatto che una particella posta in un canale si posiziona a una distanza precisa rispetto alle pareti a seconda della sua dimensione. Attraverso dei canali perpendicolari a quello principale si riescono, quindi, a separare particelle con diametro diverso. Con questo tipo di dispositivi è possibile sia cambiare la concentrazione delle particelle nel campione che separare le particelle. La soglia di filtrazione è determinata dal profilo del flusso all'interno del canale e non dalla dimensione della sezione dei canali (come nel PFF), evitando quindi il problema dell'occlusione che ci potrebbe essere dovendo diminuire le dimensioni dei canali. Quando il flusso è basso nessuna particella entrerà nei canali a lato perché la sua posizione seguirà il profilo della parete; dai rami laterali potrà quindi uscire solo liquido e questo andrà a rendere più concentrata la soluzione che scorre nel canale principale. Aumentando il flusso sui rami laterali è possibile selezionare una determinata dimensione delle particelle per separarle dalle altre. (Figura 1.2.9)

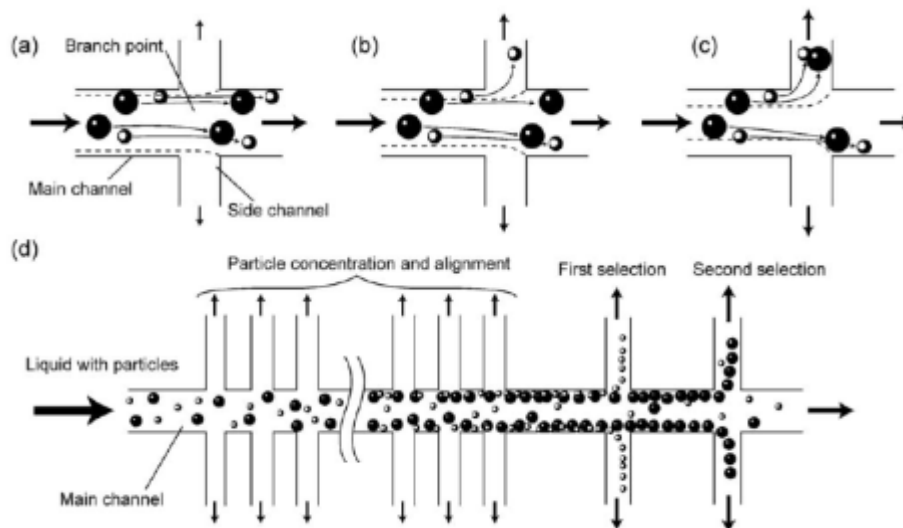


Figura 1.2.9 Principio della filtrazione idrodinamica. (a)-(c) Diagrammi schematici che mostrano il comportamento delle particelle lungo un ramo; (a) la portata distribuita nel canale laterale è bassa, (b) media e (c) alta. Le linee tratteggiate mostrano i confini virtuali della distribuzione di flusso all'interno del canale principale e dei suoi lati. (d) Diagramma schematico che mostra la concentrazione e la distribuzione in un microcanale che ha molte ramificazioni. [Yamada et al., 2005]

- Separazione per gravità con amplificazione idrodinamica [Huh et al., 2007]

Nell'articolo di Huh et al. si sfrutta questa tecnica per sviluppare un dispositivo formato da tre ingressi: due per il fluido e uno per le particelle. I tre ingressi vanno a formare un unico canale convergente dove liquido e particelle scorrono paralleli e la forza di gravità li guida verso il fondo dove è posto un canale di separazione, inclinato di 90° rispetto al canale convergente. Il canale di separazione si amplia gradualmente in modo tale che la velocità media del flusso diminuisca. Le particelle risentono della gravità e hanno una velocità di sedimentazione che a pari densità varia al

variare del raggio della particella (velocità di sedimentazione maggiore per particelle più grandi). Allo stesso tempo la componente di velocità in direzione della gravità è minore sulla parete superiore del canale e maggiore sulla parete inferiore e questo fa ampliare le linee di flusso. Le particelle più grandi, che sedimentano prima, sono perciò portate verso la parete inferiore del canale a maggior velocità; si amplifica, quindi, la differenza di posizione tra particelle di ampiezza differente. Velocità di sedimentazione e diminuzione della velocità causata dall'aumento della larghezza del canale lavorano sinergicamente in questo tipo di dispositivo per amplificare la distanza di separazione tra le particelle con diametro differente. Il limite del metodo è che la separazione è efficiente per differenze grandi di taglia delle particelle. (Figura 1.2.10)

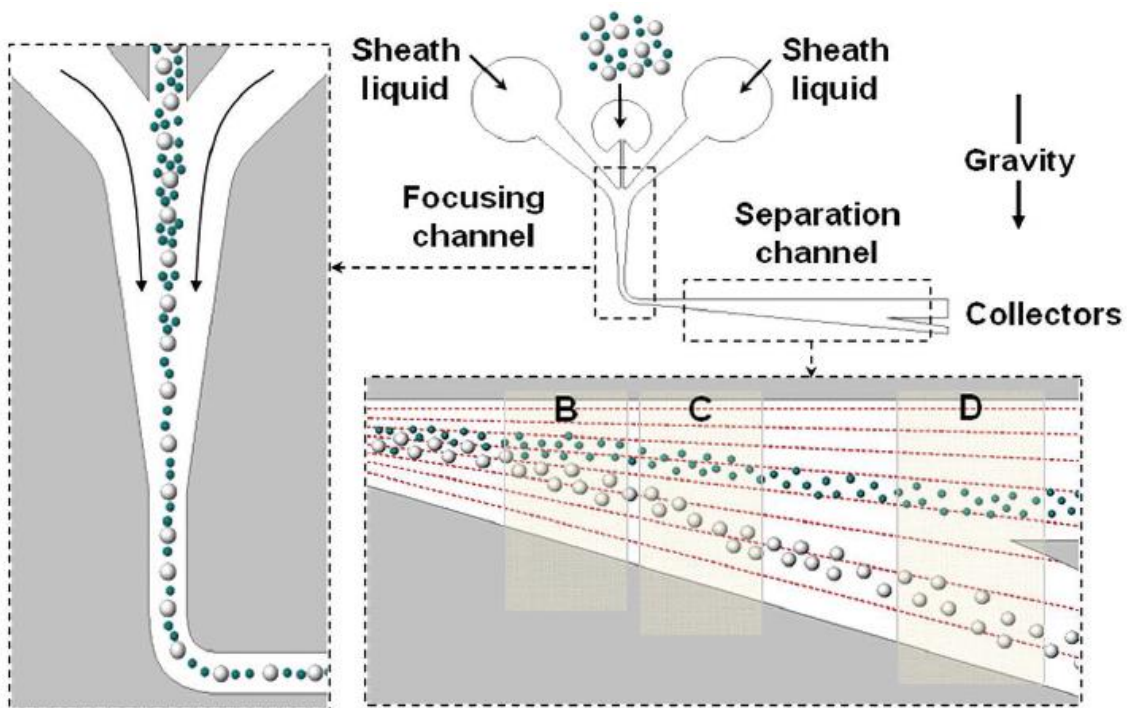


Figura 1.2.10 Le particelle sono introdotte nel canale centrale del dispositivo e concentrate dai flussi laterali nel canale verticale (A). Entrando nel canale di separazione orizzontale il flusso assume una direzione perpendicolare alla forza di gravità e avviene la sedimentazione delle particelle in esso presenti che assumeranno posizioni differenti a seconda del loro diametro (a parità di materiale). La differenza di posizione in senso verticale tra le particelle di diversa dimensione aumenta lungo il canale orizzontale a causa dell'ampliamento della sua geometria (B e C). In (D) le particelle sono separate e isolate tramite due diversi canali di uscita in cui si convogliano flussi contenenti particelle di diverse dimensioni. [Huh et al.,2007]

- Canale microfluidico a geometria variabile [Park et al.,2009][Hur et al.,2011]

Questo dispositivo sfrutta una particolare geometria del canale per dividere le cellule, combinando l'effetto delle forze di inerzia con quello dei flussi turbolenti secondari. I parametri in gioco sono il numero di Reynolds, la lunghezza del microcanale e la frazione di volume delle particelle in sospensione. Normalmente quando una particella fluisce all'interno di un condotto piano con moto di Poiseuille si posiziona in una particolare posizione tra la parete e la linea di mezzieria dovuta

all'equilibrio tra la forza indotta dal gradiente di velocità e la forza indotta dall'effetto di parete. (Figura 1.2.11 (a)) Costruendo una geometria composta da canali che si espandono e si restringono e agendo sul numero di Reynolds si può prevedere dove le particelle si posizioneranno. Flussi secondari turbolenti, infatti, si creano all'espansione del canale e numeri di Reynolds maggiori creano zone di separazione più ampie, così che le particelle riescono a dividersi maggiormente e assumere una posizione calcolabile all'interno del canale. (Figura 1.2.11 (b)(c)) Il metodo ha i vantaggi di non richiedere forze esterne, inoltre il dispositivo è facilmente fabbricabile, il processo è veloce, non richiede l'uso di strutture ostacolo nel canale e si può usare una semplice pompa siringa per indurre il flusso. Gli svantaggi sono che per avere un valore massimo rilevante di forza di inerzia le particelle devono essere rigide, la concentrazione non deve essere troppo elevata e il flusso deve essere mantenuto entro certi range.

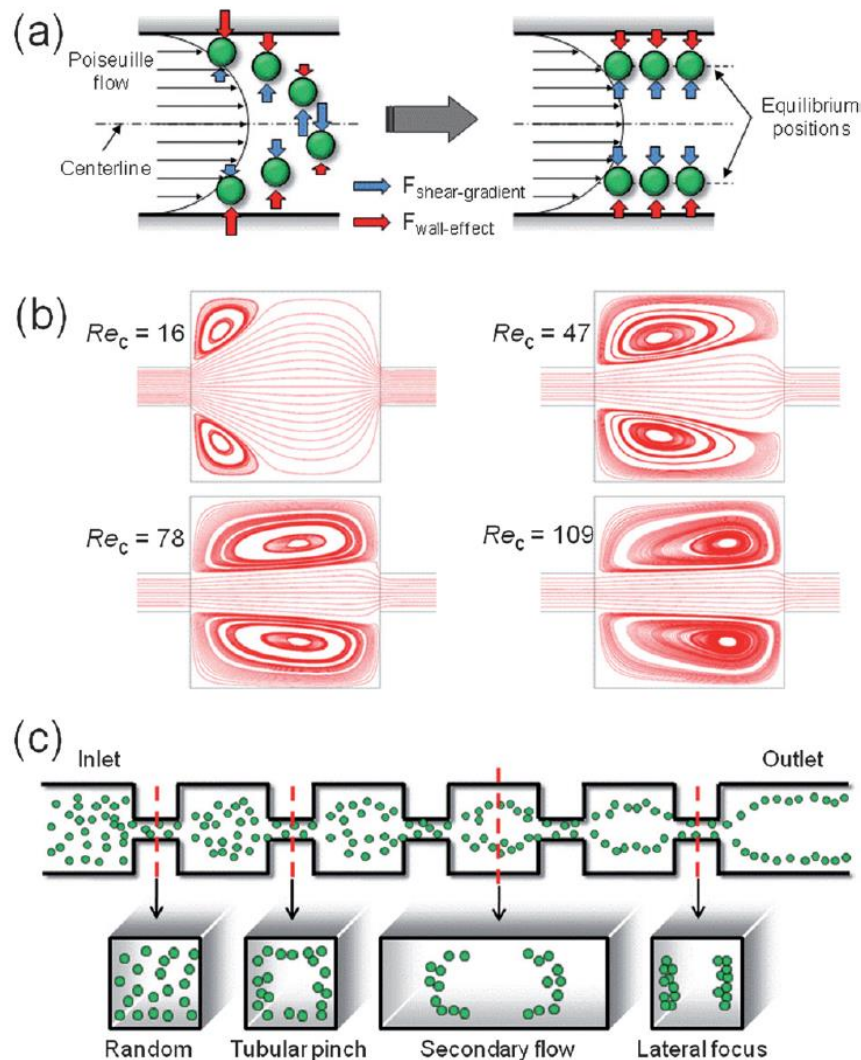


Figura 1.2.11 (a) Forze inerziali agenti sulle sfere rigide sottoposte a un flusso di Poiseuille. (b) Vortici di flusso creati dall'espansione e dal restringimento del canale per diversi numeri di Reynolds. (c) Schema del processo di focusing inerziale nel microcanale. [Park et al.,2009]

- Separazione di particelle attraverso lo spostamento [Huang et al., 2004]

In questo tipo di dispositivi di microfluidica si utilizzano ostacoli con una geometria precisa disposti in righe ordinate a larghezza costante e intervallate da vuoti a larghezza stabilita. Questo consente di separare particelle di dimensione differente. In base alla larghezza della distanza tra gli ostacoli, infatti, si possono avere due effetti: quello a zig-zag, ovvero la particella si muove cambiando direzione ma dopo una serie di righe torna nella posizione iniziale (Figura 1.2.12 (B)) o il *displacement mode*, dove la particella essendo troppo grossa segue un percorso che non le fa cambiare direzione (Figura 1.2.12 (C)). Costruendo degli array dove le larghezze dei gap variano cambiando fila è possibile separare in modo sequenziale particelle a diametro differente.

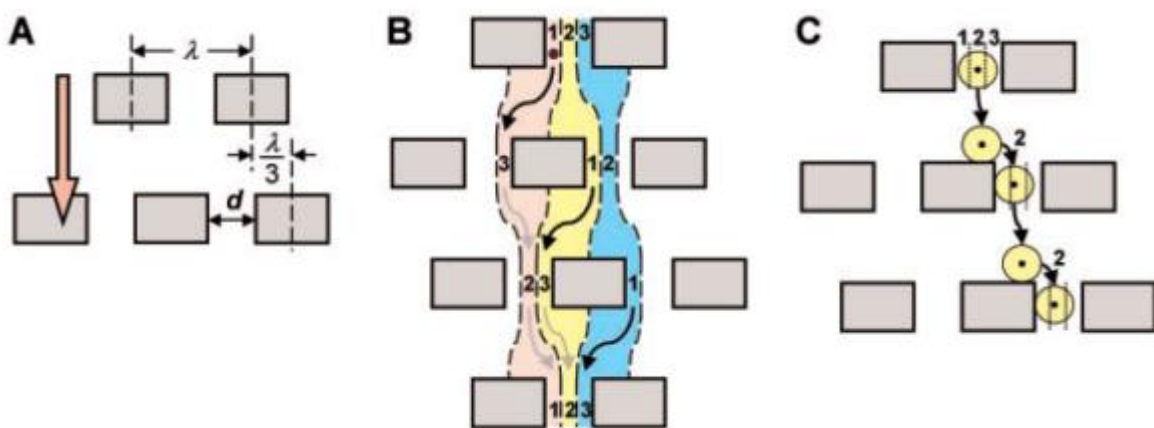


Figura 1.2.3.12 (A) Parametri geometrici che definiscono il pattern di ostacoli. La freccia arancione indica la direzione del flusso applicato. (B) Tre flussi (rosso, giallo e blu) non si mischiano nello spazio tra due ostacoli scorrendo attraverso la matrice. La corsia 1 alla prima riga diventa 3 nella seconda riga, la corsia 3 diventa la 2 alla terza riga e così via. Le particelle piccole, seguendo le linee di flusso rimarranno sulla stessa corsia. (c) Una particella con un raggio maggiore della corsia 2 si muoverà attraverso questa. (*displacement mode*). [Huang et al., 2004]

- Microcanali a spirale [Kuntaegowdanahalli et al., 2009]

Questo tipo di dispositivo a spirale permette di separare le cellule con diametro diverso sfruttando il principio di Dean accoppiato a forze inerziali. La posizione di equilibrio assunta dalle particelle nel canale, infatti, risulta essere dipendente dal rapporto tra la forza inerziale e la forza di Dean, che varia con la terza potenza del diametro della particella. La forza di Dean, inoltre, aumenta con l'aumento dell'altezza del canale, mentre la forza di lift diminuisce all'aumentare dell'altezza del canale. Se il rapporto tra il diametro particella e il diametro idraulico del canale è maggiore di 0.07 domina la forza di lift. In base a questo principio le particelle a diametro maggiore, che risentono maggiormente della forza di lift, si posizioneranno più vicine alla parete, mentre quelle più piccole, che risentono maggiormente della forza di Dean, si posizioneranno più verso il centro del canale. All'uscita dal dispositivo, quindi, le particelle risulteranno divise in base al loro diametro. (Figura 1.2.3.13)

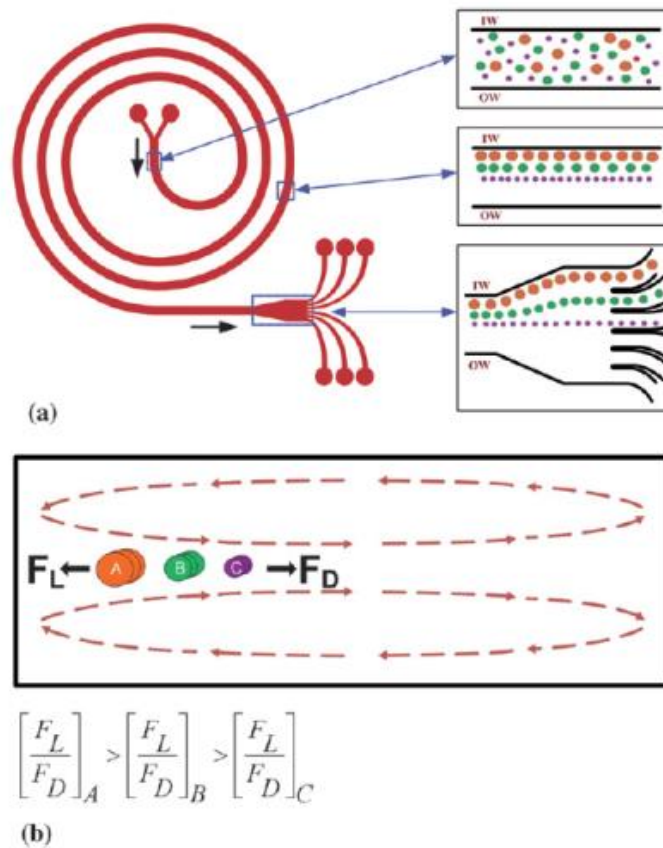


Figura 1.2.13 (a) Schema del microcanale a spirale. Le particelle disperse casualmente si posizionano successivamente in una posizione di equilibrio lungo la parete interna del canale (IW) sotto l'influenza della forza di lift (F_L) e della forza di drag (F_D). La separazione tra i flussi contenenti particelle di diverse dimensioni aumenta con l'aumento della larghezza del canale. L'estrazione dei diversi flussi dal dispositivo avviene grazie a diversi canali di outlet. (b) Sezione del microcanale che evidenzia gli effetti di F_L e F_D sulle particelle. Il rapporto (F_L / F_D) è il fattore determinante che permette a particelle con un dato diametro di trovare una posizione di equilibrio nel flusso. [Kuntaegowdanahalli et al., 2009]

- Separazione inerziale in canali curvi [Di Carlo et al., 2007]

Lo stesso principio di funzionamento del dispositivo a spirale usato nell'articolo precedente è alla base di questo tipo di dispositivi. In un canale curvo il bilancio tra la lift force e le forze di Dean dovute alle forme curve del dispositivo determinano la posizione della particella. Il numero di Dean deve essere sotto il 20. In particolare quando le particelle entrano in un canale con curve simmetriche i flussi diventano due, quando entrano in un canale asimmetrico si forma un unico flusso di particelle. (Figura 1.2.14)

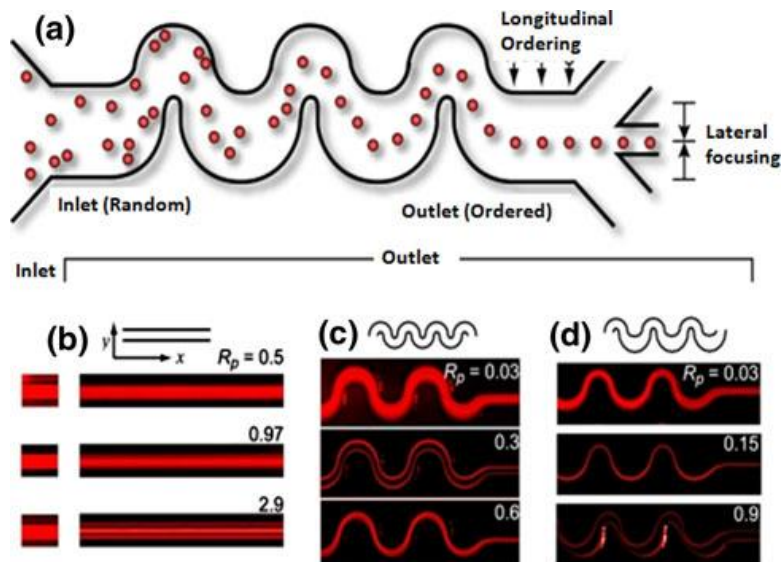


Figura 1.2.14 (a) Disegno schematico del processo inerziale di separazione. Fluendo lungo il canale, le particelle disperse inizialmente in modo casuale si ordinano sia longitudinalmente che lungo la larghezza del canale. (b) Viste dall'alto di un tracciante fluorescente che colora particelle dal diametro di $9 \mu\text{m}$ in un canale quadrato ($50 \mu\text{m}$) riempito di acqua (densità $\rho = 1.00 \text{ g/mL}$ e viscosità dinamica $\mu = 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$). Il flusso scorre da sinistra a destra. Nell'inlet mostrato a sinistra le particelle sono distribuite uniformemente nel fluido. A destra le immagini sono quelle della zona a 3 cm dall'outlet per tre diversi numeri di Reynolds delle particelle ($R_p = 0.48, 0.97$ o 2.9). Si osserva come si formino quattro diverse linee di flusso. Dall'alto questo appare come tre linee, con quella centrale che ha intensità doppia rispetto alle altre. (c) La geometria curva e simmetrica riduce le linee di flusso a due. Sopra un valore critico del numero di Dean il focusing viene perturbato. (d) La geometria curva e asimmetrica garantisce un unico flusso di focusing. [Di Carlo et al., 2007]

- Altri tipi di geometria usati per la selezione di cellule:

Weir type

Questi dispositivi microfluidici utilizzano dei gradini per separare cellule (che si fermano prima del gradino) dal plasma oppure per separare cellule più piccole, che riescono a oltrepassare il gradino e avanzano rispetto a quelle più grandi che rimangono bloccate. (Figura 1.2.15)

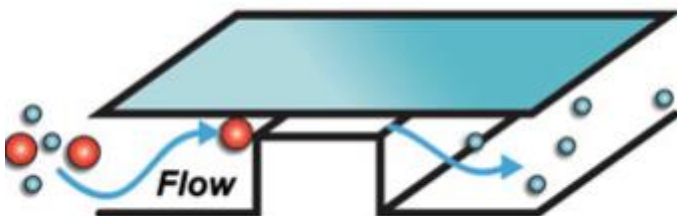


Figura 1.2.15 Geometria a gradini.

Pillar type

Attraverso l'utilizzo di ostacoli a pilastro le cellule più grandi rimangono bloccate, mentre le più piccole avanzano. In questo modo si selezionano le cellule di interesse, tuttavia è presente il

problema della formazione di clot, che possono alterare il funzionamento del dispositivo. (Figura 1.2.16)

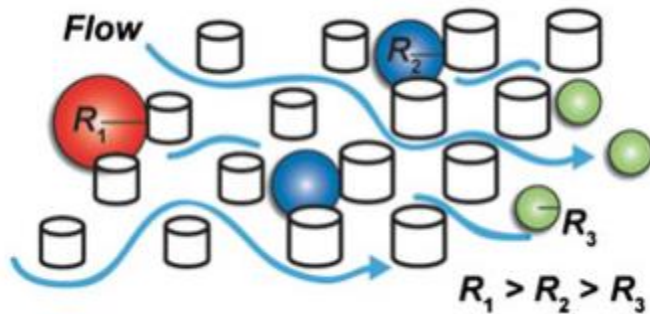


Figura 1.2.16 Geometria a pilastri.

Cross Flow

In questo tipo di dispositivi strutture quadrate laterali formano dei piccoli canali perpendicolarmente alla direzione del flusso. Solo le cellule di minor diametro riescono a passare attraverso i canali laterali. In questo modo si determina la selezione di tali cellule dal resto del campione. (Figura 1.2.17)

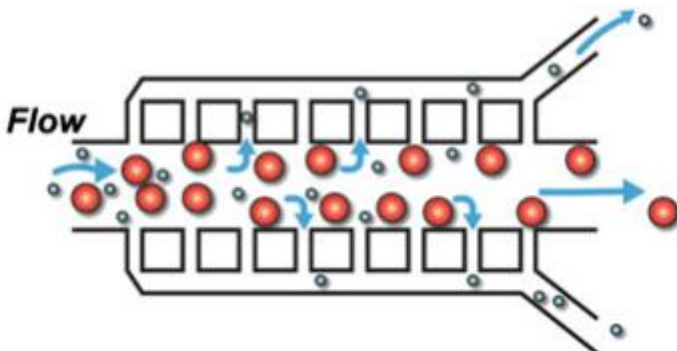


Figura 1.2.17 Geometria a flusso incrociato.

Tecniche di adesione selettiva delle cellule

La tecnica di adesione selettiva delle cellule unita alla microfluidica risponde all'esigenza di poter creare dispositivi in grado di selezionare in modo efficace tipologie cellulari specifiche. Tale tecnica è conveniente sia perché non richiede forze esterne se non un generatore di flusso, sia perché la separazione non dipende dalle proprietà fisiche quali dimensione e densità delle cellule. La strategia utilizzata è quella di ricoprire una superficie del dispositivo con peptidi, ligandi o aptameri, che leghino in modo specifico la tipologia di cellula che si vuole selezionare. L'efficienza della selezione e del legame cellula-ligando dipende non solo dalla forza del legame, ma anche dalla

fluidodinamica del dispositivo. L'adesione cellulare è influenzata dallo shear stress del flusso nel dispositivo (in generale se quest'ultimo aumenta diminuisce il tasso di adesione), così come dalla topografia del dispositivo, dalla concentrazione e dalla specificità delle molecole adesive. Dispositivi microfluidici che presentano canali con curve spigolose non sono ottimali per l'adesione. Nel caso le curve siano necessarie dovrebbero essere gradualmente per mantenere una velocità uniforme. Se le cellule da catturare sono rare e quindi la superficie di adesione necessaria è piccola usare canali dritti è la migliore opzione, se invece si ha bisogno di un'ampia superficie adesiva un'alternativa possibile è la geometria a spirale, che riesce a mantenere lo shear stress quasi costante lungo la larghezza del canale. [Didar et al.,2010] La progettazione del design e della geometria del dispositivo microfluidico assume pertanto un ruolo fondamentale nelle tecniche di adesione selettiva in quanto la fluidodinamica dovrà favorire la possibilità di contatto cellula-ligando, al fine di aumentare l'efficienza della selezione. Inoltre, poiché generalmente i costi di peptidi, di aptameri e di rivestimento delle superfici sono molto elevati, il controllo della fluidodinamica risulta essenziale e utile nella riduzione dei costi di fabbricazione. Infatti andando a concentrare le cellule da selezionare in determinate zone del dispositivo, sarà possibile effettuare una modifica superficiale che induca adesione in una parte minore di superficie, riducendo notevolmente i costi di produzione.

In letteratura gli esempi di studi di dispositivi microfluidici che attuano una selezione cellulare col metodo di adesione selettiva sono innumerevoli. Essi, in particolare, si concentrano sull'ottimizzazione della geometria del dispositivo e della sua fluidodinamica in modo che le cellule entrino in contatto con le regioni modificate superficialmente. Questa modalità di adesione cellulare associata alla geometria del dispositivo prende il nome di GEDI (geometrically enhanced differential immunocapture). Vengono descritti brevemente di seguito alcuni degli studi più significativi presenti in letteratura.

Nell'articolo di Chang et al. l'obiettivo è la progettazione di un dispositivo microfluidico in grado di catturare selettivamente specifiche cellule, che vengono fatte passare in sospensione e concentrate lungo il canale. Successivamente tra le cellule aderenti si vuole fare una divisione cromatografica basata sulla differenza di velocità dei diversi tipi di cellule lungo il canale. Il dispositivo è trattato superficialmente con selectina, una proteina che fa aderire alcuni tipi di cellule. Per massimizzare il contatto tra le cellule e le superfici modificate si studiano due tipologie di colonne nel dispositivo: quadrata e rettangolare (con il lato lungo nel verso del fluido) (Figura 1.2.18). La geometria quadrata fa sì che le streamlines siano dritte e che dietro a ogni pilastro ci sia una regione dove il flusso è molto rallentato. La geometria rettangolare, invece, crea linee di flusso curve, non lineari e il lato corto essendo più snello evita la creazione di zone a flusso più lento. L'efficienza nel

catturare le cellule sui pilastri è inizialmente molto più elevata per la geometria rettangolare, successivamente però, quando la concentrazione della sospensione cellulare aumenta, l'efficienza di cattura della geometria quadrata migliora parecchio raggiungendo i livelli della geometria rettangolare. Questo fatto potrebbe essere associato alle linee di flusso che essendo curve e non lineari nella geometria rettangolare permettono alle cellule di toccare i pilastri e aderire. Nella geometria quadrata solo quando la concentrazione è abbastanza elevata le linee di flusso si modificano dalla forma lineare e le cellule deviano dalle linee di flusso andando con maggior probabilità a toccare i pilastri. [Chang et al., 2005]

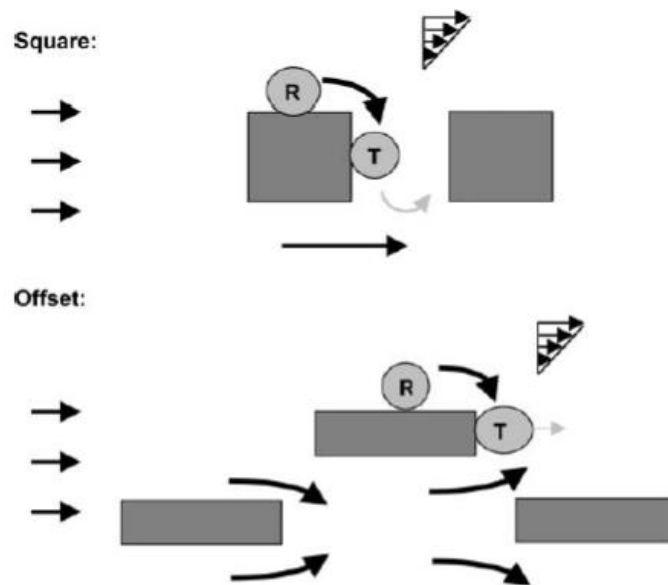


Figura 1.2.18 Fasi del movimento cellulare all'interno del dispositivo. Quando una cellula aderisce alla superficie laterale dei micro-pilastri (R), risente dello sforzo di taglio del fluido (relativo alla superficie) in direzione tangenziale e quindi ruoterà lentamente. Quando la cellula raggiunge la fine del pilastro, lo sforzo di taglio del fluido la spinge perpendicolarmente (T). La cellula si lega alla superficie per un breve periodo prima di staccarsi e rientrare in sospensione. Nel caso di pilastri quadrati, a causa di un flusso più lento dietro gli ostacoli, le cellule che rientrano in sospensione sono quasi sempre ricatturate dal pilastro successivo. [Chang et al., 2005]

Negli articoli [Nagrath et al.,2007], [Smith et al.,2014] e [Gleghorn et al., 2010] vengono studiate le traiettorie di flusso in dispositivi microfluidici che presentano micropilastri cilindrici. La disposizione e le dimensioni dei pilastri influenzano le linee di flusso del fluido e di conseguenza il moto delle cellule sospese. Ottimizzando questi parametri è perciò possibile aumentare l'efficienza del contatto tra le cellule rare, in questi casi tumorali, che si vogliono selezionare e i pilastri, ricoperti da anticorpi specifici per quel tipo di cellula. Gli autori Nagrath et al. e Smith et al. sopraccitati si avvalgono dell'uso del programma di simulazione fluidodinamica computazionale COMSOL per analizzare come cambia la fluidodinamica del dispositivo al variare dei parametri geometrici di raggio e distanza tra gli ostacoli. (Figura 1.2.19)

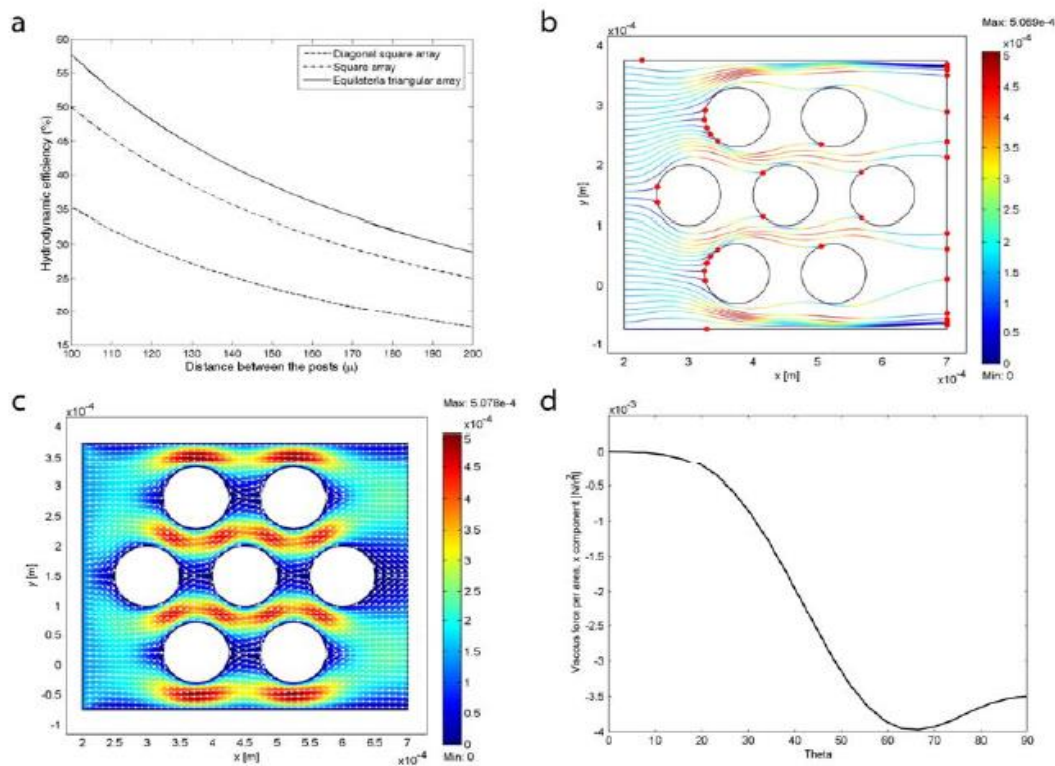


Figura 1.2.19 (A) Relazione tra efficienza idrodinamica e distanza tra gli ostacoli per differenti geometrie di array (quadrati, quadrati diagonali e triangoli equilateri) (B) Analisi computazionali. Le traiettorie delle cellule sono indicate dalla linea continua, la posizione finale da punti rossi. Le cellule che partono da posizioni intermedie tra i pilastri seguono le linee di flusso senza mai toccare questi ultimi e non possono essere catturate. Per ovviare a questo problema, si effettua uno shift verticale di 50 μ m ogni tre righe di pilastri, in modo da forzare le cellule a cambiare traiettoria e aumentare la probabilità di scontro con i pilastri. (C) Profilo di flusso presente nell'array. I vettori di velocità e le linee di flusso sono colorate in base al valore di velocità del flusso in quel punto. (D) Grafico dello sforzo di taglio lungo la superficie del pilastro. [Nagrath et al.,2007]

Un simile approccio è utilizzato dallo studio di Gleghorn et al. dove in particolare viene correlata la geometria del dispositivo alla probabilità di collisione tra cellule e micropilastri cilindrici, dimostrando come la disposizione degli ostacoli può influenzare il diametro delle cellule che andranno a toccare i pilastri con maggior probabilità. (Figura 1.2.20) E' possibile, perciò, selezionare cellule dal diametro desiderato associando una geometria adeguata del dispositivo e la copertura superficiale dei pilastri con anticorpo specifico.

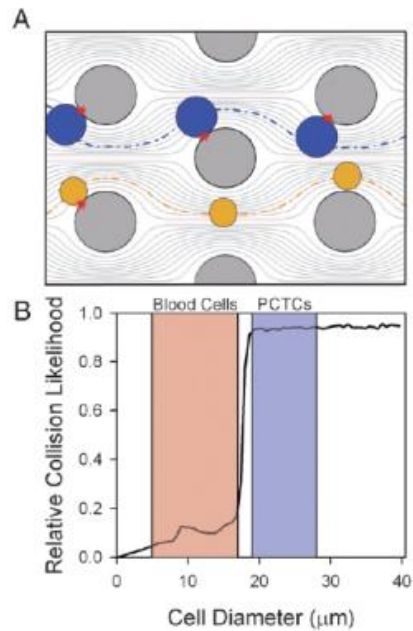


Figura 1.2.20 Nella tecnica GEDI (geometrically-enhanced differential immunocapture) gli ostacoli creano distorsioni nelle linee di flusso, causando l’impatto tra parete e cellula. La posizione degli ostacoli (cerchi larghi grigi) è scelta in modo da creare l’impatto tra la parete degli ostacoli e il target di cellule che si vuole selezionare. (A) Cellule più grandi (PCTCs e LNCaPs, cerchi blu) seguono linee di flusso che urtano i pilastri mentre le cellule più piccole (cerchi gialli) attraversano il dispositivo avendo meno interazioni con i pilastri. (B) Simulazioni effettuate in silico permettono di predire la frequenza di collisione parete-cellula in base al diametro cellulare. [Gleghorn et al., 2010]

Vengono prese in considerazione anche altre forme geometriche di pilastro oltre a quella cilindrica: per esempio l’articolo di Howard et al. effettua un’analisi fluidodinamica di pilastri a forma di cuscinetto sempre ricoperti con una proteina adeguata a selezionare cellule rare. [Howard et al., 2014]

L’uso di una geometria basata su pilastri non è l’unica alternativa di adesione selettiva. Nell’articolo di Wang et al., gli autori sfruttano superfici modificate con un substrato particolare in grado di far aderire cellule tumorali e una geometria a serpentina posta superiormente che crea un flusso verticale caotico del fluido. La parte superiore ha lo scopo di aumentare la frequenza del contatto tra cellule e substrato adesivo. Dallo studio si evince che con un flusso di 1mL/h il 70% delle cellule vengono catturate nel primo quarto del microcanale. Aumentando il flusso l’efficienza nel catturare le cellule diminuisce sia perché l’interazione delle cellule con il substrato modificato è inferiore sia perché aumenta la forza di drag.(Figura 1.2.21) [Wang et al., 2011]

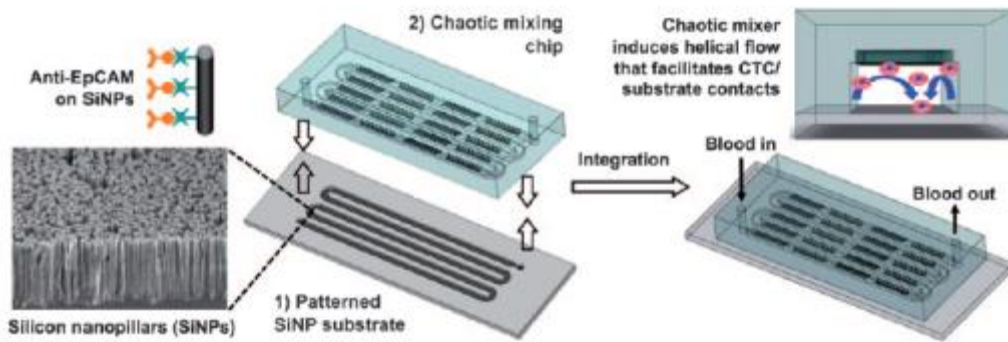


Figura 1.2.21 Rappresentazione schematica della configurazione e del funzionamento di un dispositivo integrato per la cattura di cellule tumorali (CTCs). Il dispositivo è composto di due componenti funzionali, un substrato di nano-pilastrini di silicio (SiNP) ricoperti anti-EpCAM, integrati in grado di migliorare la cattura delle cellule target e un chip da inserire superiormente caratterizzato da una geometria che crea microvortici capace di aumentare la frequenza di collisione tra cellule e substrato. [Wang et al., 2011]

Stott et al. invece propongono una geometria a lisca di pesce con l'obiettivo di spezzare le linee del flusso laminare del dispositivo in modo da massimizzare le collisioni tra le cellule che devono essere isolate e le superfici ricoperte con l'anticorpo che le fa aderire. (Figura 1.2.22) [Stott et al., 2010]

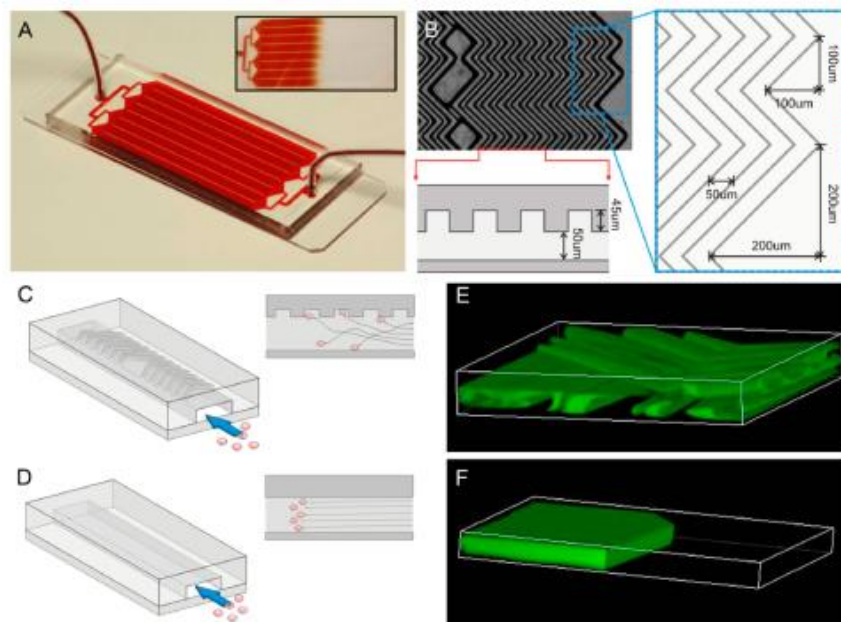


Figura 1.2.22 (A) Il dispositivo è formato da un array di canali microfluidici con singola entrata e singola uscita. (B) La geometria superficiale del dispositivo è a lisca di pesce con parti asimmetriche e parti che si ripetono. Il disegno in (C) illustra l'interazione cellula-superficie in confronto con una geometria tradizionale che non presenta ostacoli (D). Studi sperimentali di visualizzazione del flusso che usano due flussi della stessa viscosità dimostrano che i microvortici caotici generati nella geometria a lisca di pesce (E) creano un miglior rimescolamento del flusso rispetto a un dispositivo tradizionale a superfici piate (F). [Stott et al., 2010]

Un altro esempio di geometria associata a superfici ricoperte da proteine che selezionano cellule specifiche è presente nell'articolo di Adams et al. dove viene proposto un dispositivo composto da 51 microcanali ($35\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$) su PMMA per isolare cellule tumorali analizzando volumi superiori a 1mL in periodi brevi di tempo ($<37\text{min}$). Le superfici dei microcanali sono ricoperte con una proteina specifica per le cellule tumorali, la mABs. La geometria del dispositivo è ottimizzata per aumentare l'interazione superficie-cellule e quindi l'efficienza di cattura. (Figura 1.2.23) [Adams et al., 2008]

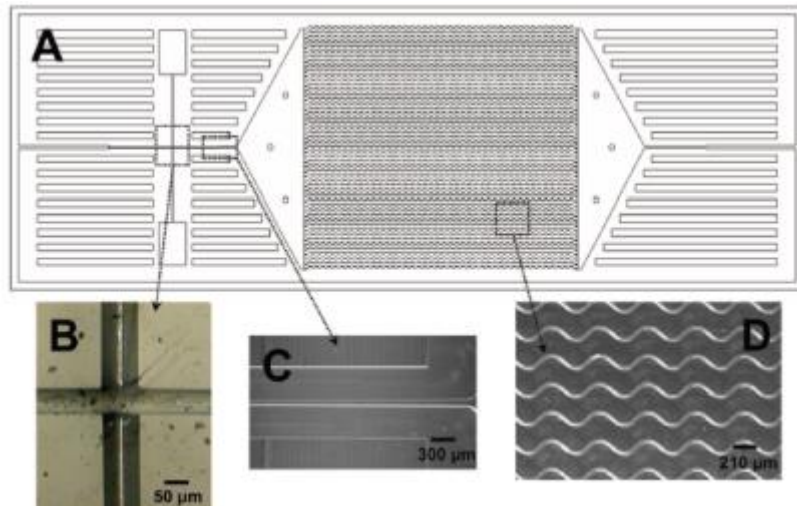


Figura 1.2.23 (A)Disegno CAD dei canali a forma di sinusoidi. (B-C-D) Immagini microscopiche in campo chiaro lungo il dispositivo. [Adams et al., 2008]

Un ulteriore tipo di approccio nella progettazione di dispositivi che consentono un'adesione selettiva è proposto da Choi et al. La geometria del dispositivo è infatti progettata in modo tale da provocare una deviazione del percorso (spostamento laterale) delle sole cellule da selezionare attraverso l'uso di gradini. La topografia del dispositivo è tridimensionale e la superficie è ricoperta da una molecola adesiva. La presenza di gradini causa dei vortici e aumenta l'interazione tra le cellule e la superficie. Le cellule da non selezionare non aderiscono alla superficie ricoperta con P-selectina, seguono il flusso del liquido e non cadono nelle cavità tra un gradino e l'altro. Le cellule da selezionare, invece, aderiscono alla superficie e rotolano nelle cavità. Questo effetto, combinato al flusso in direzione assiale, le porta a spostarsi lateralmente. In questo modo vengono selezionati i due tipi di cellule che usciranno da due parti diverse del dispositivo. (Figura 1.2.24) [Choi et al., 2012]

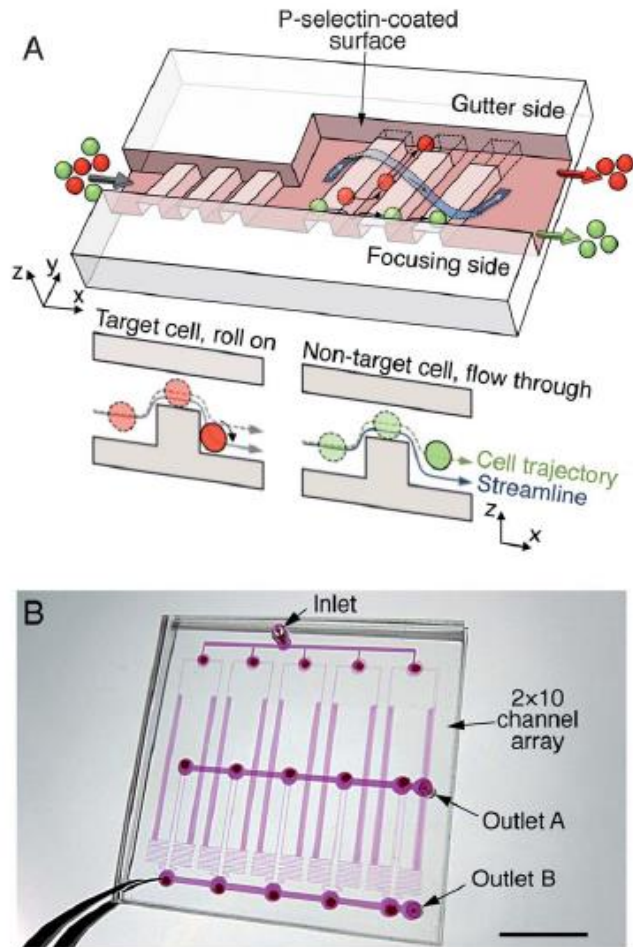


Figura 1.2.24 (A) (Sopra) Schema di un singolo canale presente nel dispositivo che comprende i gradini che indirizzano le cellule nella parte di canale più stretta e i gradini che selezionano il target cellulare nella parte di canale più ampia. La freccia blu indica una linea di flusso a elica. (Sotto) Immagine della sezione del dispositivo del canale di selezione che mostra le traiettorie percorse dalle cellule. (B) Immagine del dispositivo nel suo complesso. [Choi et al., 2012]

Una geometria molto simile a quella sopracitata è quella sviluppata recentemente da Bose et al. In questo caso il dispositivo ha l'obiettivo di separare i neutrofili dalle restanti componenti del sangue. Il dispositivo è formato da un inlet e due outlet. Strisce oblique di P-selectina innestata su un substrato di oro si alternano a strisce di PEG (polietilenglicole). La P-selectina è adesiva per le cellule da selezionare mentre il PEG è inerte per tutte le cellule. Le cellule da selezionare interagiscono con il substrato e cambiano la direzione rispetto al flusso, deviando lateralmente; le altre cellule, invece, non interagiscono con la P-selectina e procedono secondo la direzione del flusso. Alla fine del dispositivo i due tipi di cellule separati vengono raccolti nei due outlet. I patterns sono larghi $15\ \mu\text{m}$ e l'angolo di inclinazione è 15° . Il numero di Reynolds è 0.1 ed è possibile processare un volume di campione con portata di $1\ \mu\text{L}/\text{min}$. (Figura 1.2.25) [Bose et al., 2013]

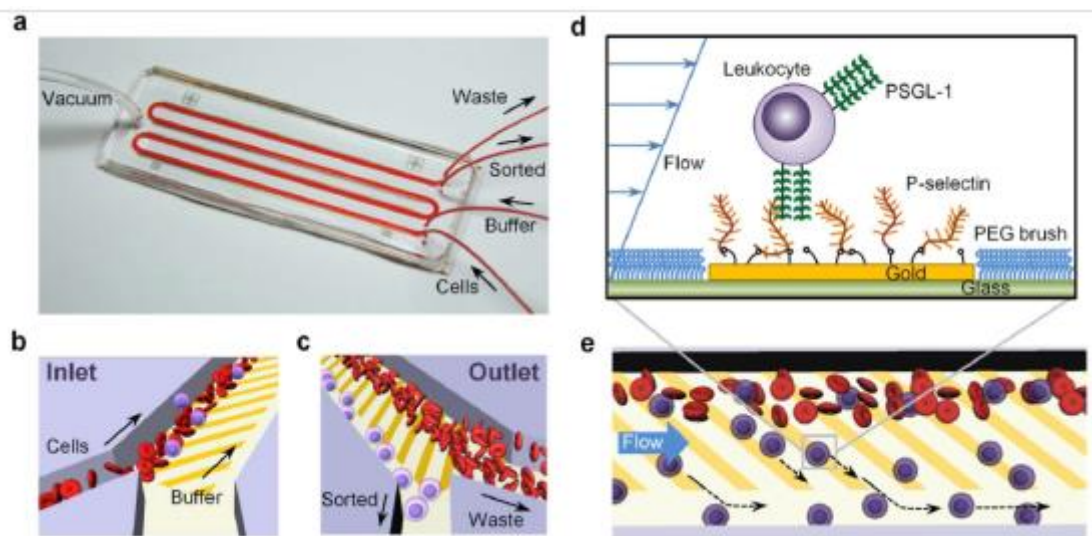


Figura 1.2.25 Design del dispositivo: un canale a serpentina con due ingressi e uscite (a). La sospensione cellulare è iniettata parallelamente a un flusso di buffer nel dispositivo (b) e all'uscita viene selezionato un flusso contenente le cellule che si vogliono selezionare separato dalla restante parte del campione cellulare (c). I lati lunghi del dispositivo sono ricoperti con strisce parallele di oro a cui si attacca la P-selectina (d), che permette alle cellule target di interagire con il pattern e rotolare su di essa (e) L'asimmetria dei pattern rispetto alla direzione del flusso altera le traiettorie delle cellule da selezionare cosicchè esse scorrano alla fine della zona ricoperta. [Bose et al., 2013]

Focusing verticale e orizzontale

Un aspetto centrale nella progettazione di un dispositivo di microfluidica per la separazione di cellule attraverso l'adesione selettiva è il focusing. Focalizzare le cellule in una specifica area della sezione del canale microfluidico è spesso un *pre-step* necessario per poterle poi separare. Questa strategia può essere utilizzata sia per aumentare l'interazione tra le zone adesive del chip e il campione, sia per evitare che le cellule vengano trascinate in zone particolari del dispositivo (ad esempio zone con shear troppo basso, zone di ricircolo che determinerebbero la sedimentazione del campione e ne impedirebbero lo scorrimento). La maggior parte dei focusing presenti in letteratura utilizza dei fluidi che indirizzano la sospensione di particelle in modo da focalizzarle in una zona della sezione del dispositivo.

L'articolo di Lee et al. descrive il focusing in microcanali rettangolari. Il dispositivo in analisi prevede un canale principale di ingresso del campione e due canali laterali per l'ingresso della portata di fluido senza particelle. (Figura 1.2.26) I modelli teorici proposti nell'articolo predicono la larghezza che la sezione del canale non investita dalle particelle avrà al variare di vari parametri (rapporto tra portata di focusing e portata del campione, altezza del canale) per un focusing simmetrico e asimmetrico. [Lee et al., 2006] (Figura 1.2.27)

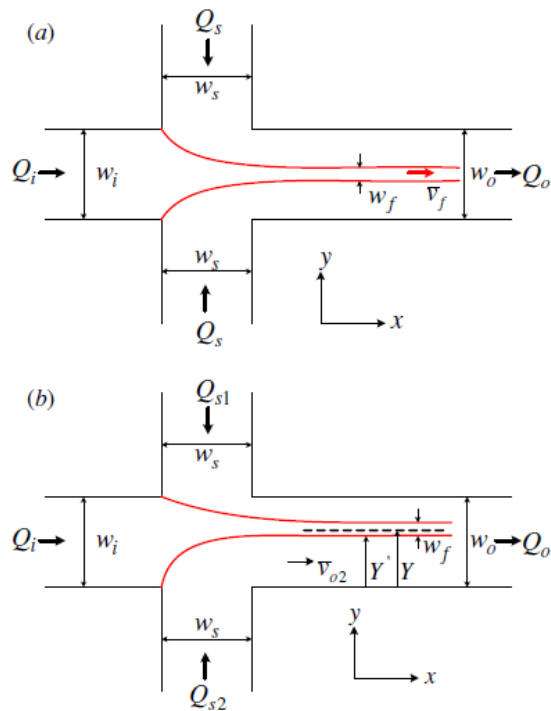


Figura 1.2.26 Disegno schematico: (a) focusing idrodinamico simmetrico (vista dall'alto) (b) focusing idrodinamico asimmetrico (vista dall'alto) Q_i è la portata di ingresso e Q_s le portate di focusing, w_i è la larghezza iniziale del flusso, w_f quella successiva al focusing. [Lee et al., 2006]

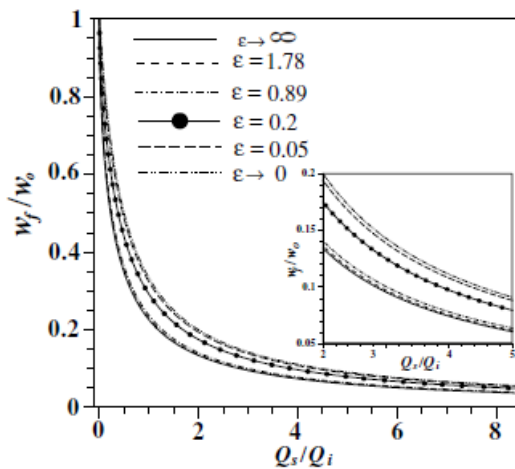


Figura 1.2.27 Grafico che mette in relazione il rapporto tra le larghezze del flusso di focusing e quella iniziale e il rapporto delle rispettive portate al variare del parametro ϵ (rapporto tra altezza e larghezza del canale). [Lee et al., 2006]

Attraverso il grafico di figura 1.2.27 è possibile decidere la portata di focusing da inserire nei canali laterali per avere una certa larghezza di focusing laterale, fissata l'altezza del canale e la portata del campione nell'ingresso principale.

Altri articoli in letteratura mostrano come realizzare un focusing verticale. Questo tipo di focusing è particolarmente indicato quando si vuole che tutte le particelle del campione inserite nel dispositivo abbiano interazione con la base del chip trattata. Watkins et al. ad esempio realizzano un focusing

verticale aggiungendo subito dopo l'ingresso principale un secondo inlet dove viene inserita la portata di focusing che ha lo scopo di 'schiacciare' le particelle del campione contro la base del dispositivo appositamente trattata. (Figura 1.2.28) [Watkins et al.,2009]

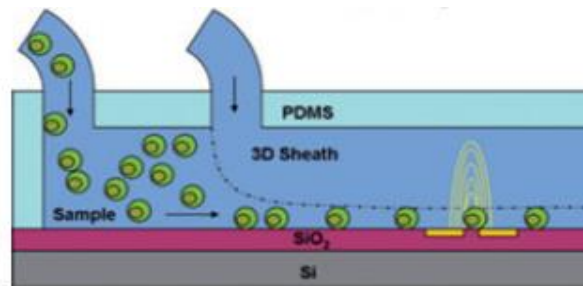


Figura 1.2.28 Disegno schematico che descrive il focusing verticale. Il flusso privo di cellule inserito verticalmente dopo l'ingresso fa aumentare l'interazione delle cellule con in fondo del dispositivo ricoperto da un substrato che lega le cellule target. [Watkins et al.,2009]

In un altro studio presente in letteratura di Hou et al. viene progettato un dispositivo che combina il focusing verticale e orizzontale. Il campione, infatti, viene prima compresso orizzontalmente da una serie di flussi laterali di focusing, dopodiché un flusso verticale schiaccia il flusso di campione verso la base del dispositivo, confinandolo in una regione stretta e ben definite all'interno del microcanale. [Hou et al., 2009]

Un altro esempio di focusing verticale e orizzontale è quello descritto da Mao et al., con la differenza che in questo caso si vuole andare a concentrare il campione nel centro del dispositivo. Come mostrato in figura 1.2.29, infatti, il dispositivo è composto da quattro inlet e un outlet. Nella prima parte del chip avviene il focusing verticale: la curva a 90° infatti causa flussi secondari (vortici di Dean) per effetto delle forze centrifughe. Questi vortici caratterizzano la parte superiore e inferiore della sezione del canale, confinando il flusso di campione nella zona centrale. Successivamente due flussi orizzontali effettuano il focusing orizzontale del campione, che complessivamente risulta scorrere nella parte centrale del microcanale. (Figura 1.2.29)[Mao et al., 2007]

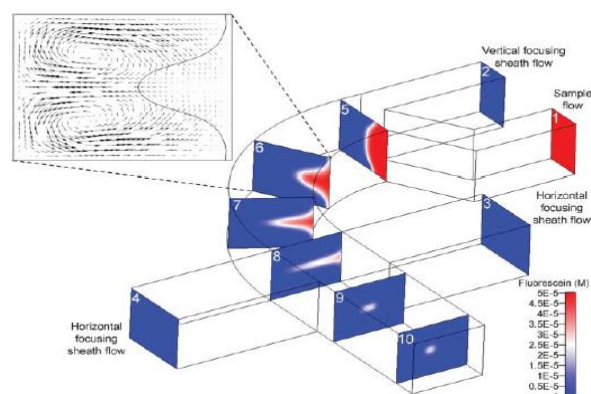


Figura 1.2.29 Focusing 3D idrodinamico che sfrutta la tecnica della deriva microfluidica. Le sezioni dalla 1 alla 10 mostrano la disposizione del fluido contenente particelle lungo la curva dove si creano vortici di Dean. [Mao et al., 2007]

Conclusioni riguardo alle tecniche di separazione cellulare

Nel corso degli ultimi circa 10 anni sono state studiate e sviluppate moltissime tecniche di separazione cellulare che si differenziano non solo per il principio di funzionamento col quale si effettua la selezione ma anche in termini di tecnologie a disposizione, costi in termini economici e di tempo, efficacia e efficienza.

In questo campo porterebbe un grosso vantaggio l'utilizzo di tecniche microfluidiche, che si sono dimostrate utilissime ed efficaci. In particolare giocando sulla geometria del dispositivo, sulle portate di inlet e di outlet è possibile controllare e regolare il fluire di una sospensione e ottimizzare la selezione cellulare su un campione con la modalità desiderata.

La necessità di riuscire a isolare determinate popolazioni cellulari, spesso rare e poco distinguibili in quanto a proprietà fisiche (dimensione e densità), ha portato a uno sviluppo parallelo di tecniche che utilizzano agenti biologici, quali anticorpi e aptameri, che meglio riescono a selezionare mediante adesione selettiva popolazioni cellulari specifiche. Uno step di selezione cellulare per densità o per dimensione può comunque essere utile in una fase iniziale di pre-selezione per eliminare componenti del campione presenti che si differenziano in termini di diametro e che non appartengono sicuramente al target che si vuole selezionare.

Quello che emerge dalla letteratura più recente è la tendenza a integrare microfluidica e adesione selettiva al fine di sfruttare le potenzialità di entrambe le tecniche e coniugarle con lo scopo di riuscire a ottenere microdispositivi che riescano a isolare popolazioni cellulari altamente specifiche in modo efficace e efficiente. Questo permetterebbe di compiere passi avanti nello studio di determinate popolazioni cellulari, nonché amplierebbe enormemente la possibilità di utilizzo di particolari tipologie cellulari, come le staminali.

1.2.4 Analisi computazionali per lo studio della microfluidica

I metodi di analisi computazionale fluidodinamica sono oggi comunemente applicati nei campi più vari dell'ingegneria. Essi rappresentano uno strumento valido per la progettazione dei componenti e dei sistemi in numerosi campi, dalle turbomacchine alle applicazioni aeree spaziali. I metodi CFD (Computational Fluid Dynamics) hanno trovato applicazione anche nel contesto dei dispositivi microfluidici. Costruire e testare più prototipi al fine di ottimizzare il dispositivo e migliorare le performance richiede tempo e costo. Le simulazioni permettono di sapere in modo rapido come un cambiamento nel design del dispositivo influenzerà la performance del chip, riducendo il numero di iterazioni nella prototizzazione. [Erickson et al.,2005] Il metodo sperimentale per caratterizzare il flusso di un fluido in un dispositivo microfluidico è la tecnica ottica della microparticle-image

velocimetry (μ PIV). Sebbene questo metodo sia affidabile, esso ha come limiti un costo notevole e tempi di procedura elevati dovuti al fatto che essendo una tecnica sperimentale è necessario produrre i prototipi per poter testare il dispositivo.

L'analisi CFD è un valido mezzo che supera questi limiti e permette un'esaustiva caratterizzazione di un campo di flusso tridimensionale. In questo modo è possibile calcolare in modo teorico i campi di velocità e i percorsi seguiti dalle linee di flusso all'interno del dispositivo prima della sua fabbricazione in modo da ottimizzarne il design, il flusso e le specifiche di progetto evitando numerosi e costosi indagini sperimentali. L'analisi CFD permette inoltre di effettuare simulazioni multiple modificando i parametri in ingresso e valutare gli effetti della variazione dei singoli parametri sull'intero sistema.

Nella microfluidica le forze di superficie sono dominanti e quindi è necessario porre un'attenzione particolare ai problemi che coinvolgono fluidi a più fasi con superfici libere che spesso sono guidate da forze capillari. Fenomeni comuni in microfluidica sono infatti l'ostruzione capillare o la formazione di bolle caratterizzate da bassi numeri di Weber e Reynolds. Un'altra caratteristica della microfluidica è l'importanza dei fenomeni di diffusione che vincono su quelli convettivi: l'elevato rapporto volume superficie concorre all'avere infatti numeri di Reynolds anche inferiori all'unità. Se per certi versi l'assenza di turbolenza può rendere più semplici le simulazioni fluidodinamiche, dall'altra parte è difficile tenere in conto i fenomeni di diffusione con un'adeguata accuratezza. Per eliminare quella che viene chiamata la diffusione numerica, ovvero la somma di tutti gli errori numerici accumulati dall'algoritmo, sarà necessario quindi usare schemi di discretizzazione di ordine elevato. [Glatzel et al.,2008]

Le tecniche di analisi computazionali possono essere divise in base al modo in cui vengono discretizzate le equazioni governanti in differenze finite, volumi finiti, elementi finiti. Le differenze finite hanno il vantaggio di essere di facile implementazione, ma il loro utilizzo è limitato a strutture rigide e con geometrie semplici come i capillari. I volumi finiti hanno il vantaggio di poter essere applicati a geometrie più complesse e non richiedono una mesh strutturata. Tuttavia a causa della difficoltà nella definizione di derivata e nella conversione di derivate di ordine superiore in derivate di ordine inferiore, il metodo è più indicato per problemi dove l'effetto viscoso è assente; questo non è il caso dei dispositivi di microfluidica dove il numero di Reynolds è basso e i termini viscosi sono dominanti. I metodi a elementi finiti oltre a presentare gli stessi vantaggi dei metodi a volumi finiti hanno una formulazione debole delle equazioni governanti più precisa; di contro il metodo presenta difficoltà con elementi dalla forma irregolare con rapporto tra i lati molto alto come nei dispositivi di microfluidica, dove spesso il rapporto tra la lunghezza e lo spessore è molto alta. Per modellizzare i processi fluidodinamici ci sono una serie di codici in commercio che non richiedono

un alto livello di conoscenza dell'analisi numerica, ma si limitano a richiedere che l'utilizzatore abbia delle conoscenze di fluidodinamica computazionale. Esempi di codici che utilizzano il VOF (volume of fluid) sono CFD-ACE+,CFX, FLOW-3D a FLUENT, mentre COMSOL e COVENTOR sono codici che utilizzano un metodo a elementi finiti. Questi codici oltre a risolvere le equazioni governanti della fluidodinamica del fluido danno la possibilità di inserire il contributo di altre forze eventualmente presenti nella realtà che si vuole simulare (gravità, forze elettriche, chimiche) e di introdurre lo studio del moto di particelle. [Erickson et al.,2005]

Con i codici computazionali è possibile simulare anche solo singole parti del dispositivo (come nel caso di simmetrie) e si possono utilizzare più processori per risparmiare sui tempi di simulazione. Tuttavia il risparmio di tempo è dipendente dalla complessità del sistema simulato e dall'accuratezza della soluzione che si vuole ottenere. E' necessario infatti, affinché i risultati siano adeguati e attendibili, un processo di generazione di una mesh appropriata, che richiede conoscenze pregresse specifiche dell'utilizzatore. I risultati andranno, infatti, osservati e validati con occhio critico mediante studi di sensitività della mesh, che attestino l'indipendenza della soluzione dalle dimensioni degli elementi e analisi del contesto simulato.

I passaggi da eseguire per effettuare un'analisi fluidodinamica computazionale efficiente sono i seguenti:

1. Disegnare la geometria tramite il programma CFD stesso o un software esterno di CAD.
2. Scegliere le opportune equazioni governanti il sistema, le condizioni al contorno e i valori iniziali.
3. Realizzare la mesh della geometria. Le equazioni governanti verranno risolte per ogni elemento della mesh sui nodi della cella, sui nodi di Gauss o sul centro cella a seconda del metodo utilizzato.
4. Calcolare la soluzione tramite opportuno algoritmo in base alla natura del problema.
5. Effettuare analisi di post-processing della soluzione calcolata tramite grafici, animazioni e disegni. [Jarvas et al.,2013]

In letteratura si possono trovare numerosi lavori che utilizzano analisi CFD applicate alla microfluidica. Yang et al., ad esempio, hanno esaminato l'allineamento delle cellule in una serie di strutture microfluidiche (con rami paralleli o perpendicolari al percorso principale) attraverso simulazioni fluidodinamiche compiute con Fluent; le simulazioni hanno permesso di migliorare il design e attenuare le forze idrodinamiche che investono le cellule [Yang et al.,2004]. Altri studi utilizzano le simulazioni fluidodinamiche per analizzare le forze e i momenti che agiscono sulla particella in un microcanale [Gaver et al.,1998] o per modellizzare il moto di particelle polarizzate positivamente in un dispositivo microfluidico di dielettroforesi [Markarian et al.,2003]. Cioffi et al.

effettuano uno studio computazionale che analizza la velocità e lo sforzo di taglio in dispositivi con pozzetti finalizzati alla cattura cellulare dimostrando che una maggiore profondità del pozzetto migliora il deposito delle cellule; questo risultato è confermato anche dai dati sperimentali. [Cioffi et al.,2010]

In conclusione l'uso delle tecniche di analisi computazionale dei fluidi permette di ottenere una dettagliata descrizione del campo fluidodinamico associato a dispositivi che contengono cellule. L'uso sinergico dei metodi sperimentali e computazionali può condurre a risultati eccellenti nei sistemi microfluidici.

1.3 Descrizione del problema e obiettivi del lavoro

Questo elaborato si inserisce all'interno di un progetto di ricerca che intende sviluppare un dispositivo microfluidico per l'isolamento di cellule staminali mesenchimali dal midollo osseo umano tramite adesione selettiva con aptamero specifico. Questa scelta è stata operata nell'ottica di integrare la microfluidica e l'adesione selettiva per riuscire a selezionare tale tipologia cellulare, il cui studio/utilizzo risulta essere molto promettente per il futuro delle scienze mediche.

A monte della progettazione del dispositivo microfluidico, in seguito all'osservazione del campione biologico di midollo osseo, che presenta caratteristiche di alta viscosità e presenza di coaguli, risulta necessaria una fase di pretrattamento del campione per renderlo omogeneo e inseribile in un dispositivo di microfluidica. Poiché non è possibile stabilire a priori se un determinato trattamento alteri le caratteristiche delle cellule staminali mesenchimali presenti nel campione, l'obiettivo di questa fase è quello di effettuare un'analisi sperimentale che identifichi e ottimizzi un protocollo di trattamento che migliori le proprietà fluidodinamiche del campione senza influire sulle proprietà delle cellule mesenchimali (resa, colonialità, differenziamento) del campione originale.

Stabilito quale sia tra quelli analizzati il protocollo migliore che non alteri le proprietà del campione e ne consenta l'inserimento in un dispositivo microfluidico, si può passare alla progettazione del design di quest'ultimo. Questa seconda fase ha come obiettivo il design e l'ottimizzazione della geometria che crei le condizioni più favorevoli per l'interazione della componente cellulare da selezionare con l'aptamero specifico che si intende utilizzare per effettuare un'adesione selettiva.

Capitolo 2

*Caratterizzazione e
ottimizzazione delle proprietà
del campione biologico*

2.1 Introduzione

Questo lavoro di tesi si colloca nell'ambito dell'isolamento delle cellule staminali mesenchimali. Una cellula staminale è una cellula in grado di generare sia cellule figlie identiche alla cellula madre, sia cellule figlie differenziate lungo uno o più linee cellulari. Le cellule staminali possono essere isolate, manipolate e fatte differenziare in vitro. Esse possono essere espanse in coltura (la capacità di espansione dipende dall'età della fonte) e purificate ad ogni passaggio per eliminare quelle differenziate. Tutti i tessuti umani sono popolati da cellule staminali, con diverso potenziale proliferativo. Il midollo osseo è tra i tessuti adulti che costituiscono una principale fonte di cellule staminali per l'ingegneria tissutale (1 staminale/10⁵ cellule). [Mantero et al.,2009]

Le cellule staminali mesenchimali hanno un futuro molto promettente in molte applicazioni mediche e in particolare nella medicina rigenerativa. Le loro caratteristiche antiinfiammatorie, antimicrobiche, antifibrotiche e rigenerative, infatti, ne rendono la gamma di applicazioni molto ampia. Attualmente sono in analisi trial clinici e studi preclinici per comprendere le loro abilità nella cura di malattie e quale possa essere il loro potenziale utilizzo. I tessuti che possono essere trattati con le cellule staminali comprendono l'osso, la pelle, la cartilagine, il polmone, il pancreas, il fegato, il tessuto nervoso, il sistema cardiocircolatorio e gastrointestinale. L'applicazione in clinica delle MSCs rappresenta una delle frontiere più innovative della medicina.[Sutton et al.,2014][Farini et al.,2014][Murphy et al.,2013]

Nel midollo osseo, in particolare, risiedono le linee staminali ematopoietica e mesenchimale. [Pittenger et al.,1999]. Il criterio comunemente accettato per definire una cellula mesenchimale è l'abilità che essa ha di formare tessuto osseo, cartilagineo e adiposo. Parecchi studi hanno dimostrato che le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo possono essere piastrate in coltura e creare colonie di cellule derivanti da singole cellule. [Bianco et al.,2001] Queste colonie sono multipotenti e possono essere indotte a diventare in vitro osso, cartilagine o grasso per mezzo di semplici procedure di coltura. [Park et al.,1999] [Kuznetsov et al.,2001]

In questo elaborato, in particolare, vengono isolate e trattate cellule staminali mesenchimali a partire da midollo osseo di scarto proveniente da pazienti sottoposti a operazioni chirurgiche di impianto della protesi d'anca presso l'Ospedale Ortopedico Galeazzi di Milano.

2.2 Problematiche e obiettivi specifici

Questo elaborato si pone l'obiettivo di svolgere i primi passi per la progettazione di un dispositivo microfluidico per l'isolamento delle cellule staminali mesenchimali presenti nel campione. All'interno del dispositivo fluirà quindi una sospensione di cellule proveniente dal midollo osseo di

pezzi ossei di scarti umani derivanti dalle operazioni chirurgiche di impianto di protesi d'anca. Date le caratteristiche di alta viscosità e la presenza di coaguli nel volume di midollo osseo è necessario che il suddetto campione venga pretrattato per rendere possibile il suo inserimento nel dispositivo di microfluidica. A seguito di queste osservazioni, si prendono in considerazione due protocolli di trattamento alternativi (Protocollo Filtrato e Lisato) a quello comunemente usato nei laboratori di ricerca (Protocollo Standard).

L'obiettivo di questa parte dell'elaborato è quello di comprendere se questi trattamenti alterano le caratteristiche delle cellule staminali mesenchimali presenti nel campione per capire quanto quest'ultimo possa essere manipolato prima dell'ingresso nel dispositivo senza cambiare le sue proprietà. In particolare si vogliono analizzare le caratteristiche di resa, colonialità e differenziamento osteogenico e adipogenico, ritenute le più significative per la descrizione del campione.

2.3 Materiali e metodi

2.3.1 Protocolli di isolamento delle cellule mesenchimali

L'isolamento delle cellule mesenchimali dal midollo osseo viene effettuato a partire da pezzi ossei di scarto provenienti da pazienti sottoposti a operazioni chirurgiche di impianto della protesi d'anca, previo consenso informato. Lo scopo di questo lavoro è quello di confrontare i tre protocolli (Standard Lisi e Filtrato) di seguito descritti.

Protocollo Standard

Il protocollo Standard prevede di effettuare le seguenti operazioni:

1. Mettere il campione di midollo nei tubi da centrifuga (volume massimo per tubo da centrifuga 40 mL).
2. Centrifugare a 1000g per 10 minuti.
3. Rimuovere il surnatante stando attenti a non aspirare il pellet di cellule. (Figura 2.3.1)
4. Lavare aggiungendo 10 mL di PBS (Phosphate buffered saline) in ogni tubo da centrifuga e unire il contenuto dei tubi da centrifuga (Il PBS è una soluzione tampone che aiuta a mantenere un pH costante e ha un'azione lievemente emolitica).
5. Centrifugare a 1000g per 10 min.
6. Togliere il surnatante.

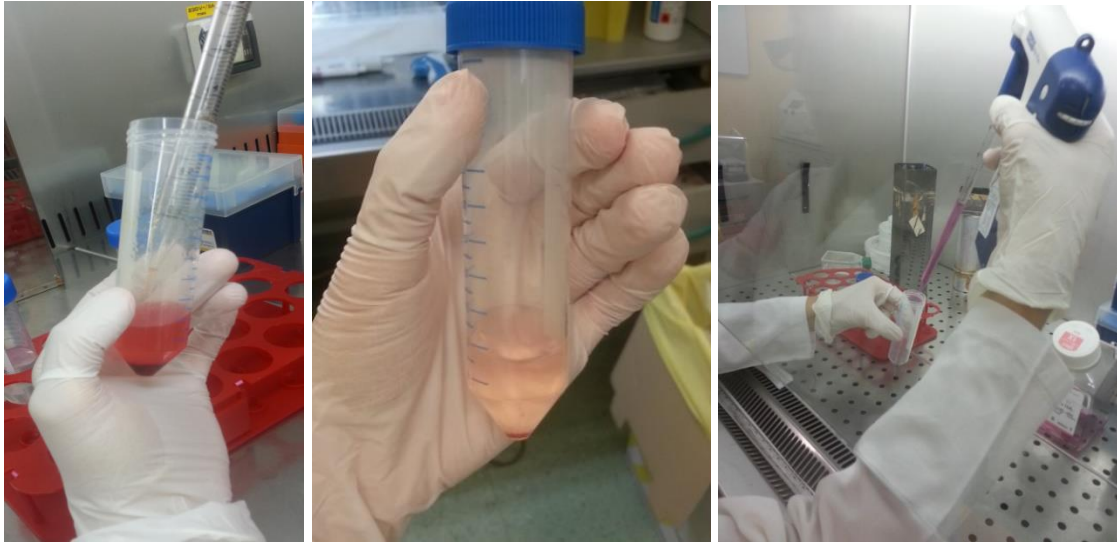


Figura 2.3.1 A sinistra: rimozione del surnatante dal campione dopo la prima centrifuga; al centro: campione dopo la seconda centrifuga; a destra: risospensione in CM.

7. Risospendere nel CM (Complete Medium) (Appendice 1) per le MSCs . (Figura 2.3.1)
8. Aggiungere al CM con le MSCs FGF (Fetal Growing Factor) (5 ng/mL) e piastrare su una flask da 25 cm² (T25).

Protocollo Filtrato

Il protocollo Filtrato prevede i seguenti passaggi:

1. Mettere il campione di midollo nel tubo da centrifuga (volume massimo per tubo da centrifuga 40 mL).
2. Centrifugare a 1000g per 10 minuti.
3. Rimuovere il surnatante stando attenti a non aspirare il pellet di cellule.
4. Aggiungere 10 mL di PBS in ogni tubo da centrifuga e filtrare tutto con un filtro da 100 µm. Se necessario aggiungere altro PBS per sciacquare il midollo, che essendo viscoso può presentare difficoltà nel passare dal filtro.
5. Centrifugare a 1000g per 10 min.
6. Togliere il surnatante.
7. Risospendere nel CM per le MSCs.
8. Aggiungere al CM con le MSCs FGF (5 ng/mL) e piastrare su una flask da 25 cm² (T25).

Protocollo di Lisi

Il protocollo di Lisi prevede l'utilizzo di un buffer di lisi con lo scopo di eliminare i globuli rossi senza danneggiare le cellule rimanenti, formato dai seguenti composti:

- 1.5 M di NH₄Cl
- 100mM di KHCO₃

- 1mM di ETDA

La soluzione deve essere successivamente filtrata con filtro sterile da 0.22 μm e conservata in aliquote a -20° .

I passaggi del protocollo di Lisi sono i seguenti:

1. Mettere il campione di midollo nei tubi da centrifuga (volume massimo per tubo da centrifuga 40 mL).
2. Centrifugare a 1000g per 10 minuti.
3. Rimuovere il surnatante stando attenti a non aspirare il pellet di cellule.
4. Scongelare il buffer di lisi e diluirlo 1:10 con acqua sterile.
5. Miscelare il midollo in rapporto 1:3 con il buffer di lisi 1X. Invertire il senso del tubo da centrifuga più volte per un miscelamento migliore.
6. Usare lo shaker orbitale a 120 rpm per 10 min a temperatura ambiente. (Figura 2.3.2)

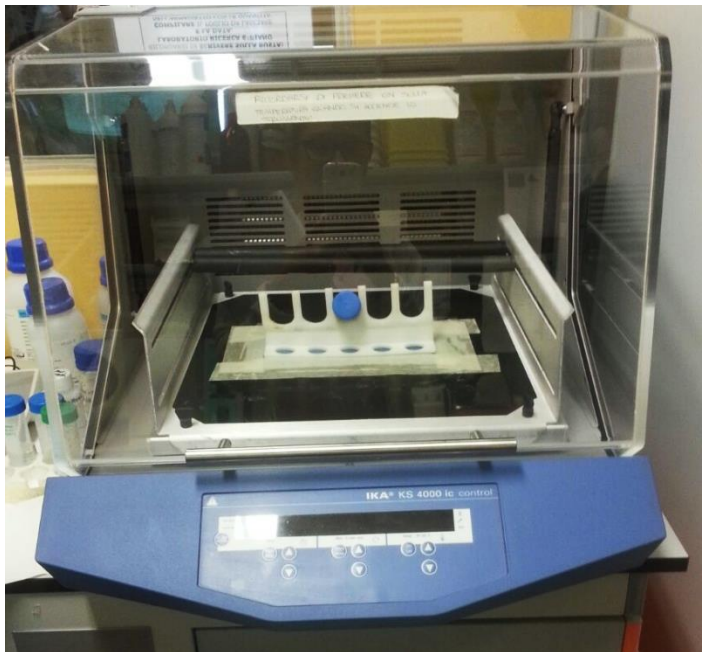


Figura 2.3.2 Shaker verticale.

7. Centrifugare il campione a 400g per 10 min a temperatura ambiente e aspirare il surnatante.
8. Lavare il pellet di cellule con il PBS, centrifugare a 400g per 10 min a temperatura ambiente.
9. Togliere il surnatante.
10. Risospendere nel mezzo di coltura (CM).
11. Aggiungere al CM con le MSCs FGF (5 ng/mL) e piastrare su una flask da 25 cm^2 (T25).

Il protocollo di isolamento Standard ha il vantaggio di richiedere un numero limitato di semplici passaggi, ma il campione risulta essere molto viscoso e quindi inadatto all'inserimento in un dispositivo di microfluidica. In particolare si rileva che in alcuni campioni il midollo osseo presenta coaguli di grandezza dell'ordine dei millimetri, che ne renderebbero impossibile l'inserimento in un chip, per questo motivo si è deciso di prendere in considerazione gli altri due protocolli. Il protocollo Filtrato differisce da quello Standard solo per la presenza del filtraggio. Esso è stato aggiunto per eliminare i coaguli più grossi di 100 μm , che potrebbero ostruire il passaggio all'interno del dispositivo progettato e per rendere il campione più omogeneo. L'aggiunta di questo passaggio non allunga i tempi del protocollo in modo significativo. Il protocollo di lisi, invece, permette la rottura dei globuli rossi, che costituiscono una componente cellulare numerosa nel campione. Tale passaggio potrebbe essere vantaggioso ai fini dell'utilizzo nel chip, perché elimina gli eritrociti dal campione consentendo una prima selezione.

Il protocollo di Lisi, inoltre, ha il vantaggio di rendere il campione meno viscoso e molto più omogeneo rispetto agli altri due. Tuttavia il numero di passaggi aumenta e i tempi del protocollo si allungano di circa mezz'ora, che corrisponde a un aumento del circa 80% dei tempi della procedura. Per confrontare rigorosamente i tre protocolli bisognerebbe sottoporre ogni campione alle tre metodiche; tuttavia essendo il volume di midollo dei campioni troppo esiguo si è deciso di confrontare le procedure Filtrato o Lisi con il rispettivo controllo isolato con protocollo Standard per ogni paziente. La presenza del controllo in ogni confronto permette di avere comunque dei risultati affidabili.

Il protocollo seguito per la prima fase degli esperimenti effettuati si è articolato nei seguenti passaggi:

- Al momento di arrivo dalla sala operatoria del campione di midollo, si raccolgono i dati del paziente (sesso, età), si verifica la presenza dello screening che permette di escludere la presenza di eventuali malattie (epatite, HIV, sifilide): solo i campioni con screening negativo vengono utilizzati per i test.
- Si porta il campione sotto cappa e si misura il volume totale del midollo.
- Si effettua una prima centrifuga a 1000g per 10 minuti.
- Viene rimosso il surnatante e il grasso lasciando la parte di midollo effettivo.
- Si misura il volume totale di midollo effettivo e lo si divide in due parti uguali, che vengono inserite in due tubi da centrifuga. Le due parti seguiranno una il protocollo standard, l'altra il protocollo di LISI o di FILTRAGGIO sopra descritti (dal punto 4 in poi). (Figura 2.3.3)

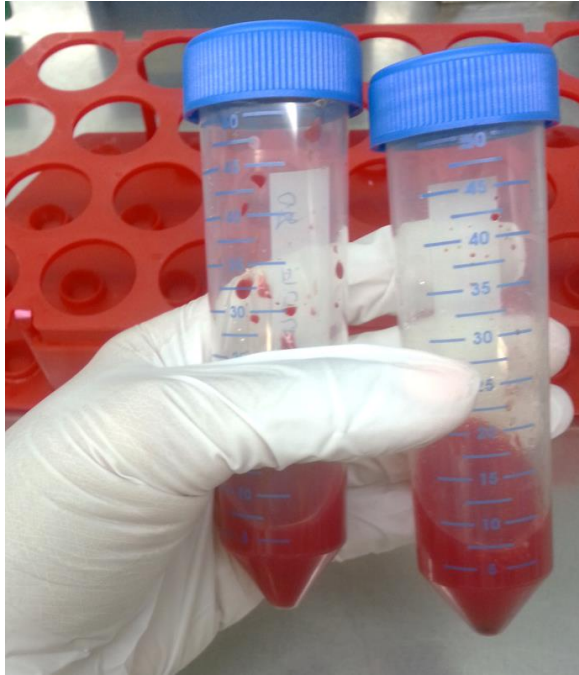


Figura 2.3.3 Divisione del volume di campione in due parti che seguiranno protocolli diversi.

Al fine di caratterizzare il campione si effettua la conta delle cellule per i due protocolli di ogni esperimento. Per la conta dei campioni che seguono il protocollo standard e filtrato la sospensione in 5 mL di mezzo delle MSCs viene ulteriormente diluita 30 volte per fare in modo che lo strumento di misura dia un valore più accurato. I campioni del protocollo lisi, invece, non subiscono l'ulteriore diluizione e vengono solo sospesi nei 5 mL di mezzo prima della conta. La conta viene effettuata con un conta-cellule automatizzato basato su analisi delle immagini acquisite (Tali®, Lifetechnologies), che fornisce il numero di cellule presente nel campione per ogni mL e che permette di misurare il diametro delle cellule che popolano il campione.

Effettuata la conta, alla soluzione di cellule con 5 mL di mezzo vengono aggiunti 50 μ L di FGF e il tutto viene piastrato in una flask da 25 cm² (T25) e messo nell'incubatore a 37°C con 5% di CO₂. (Figura 2.3.4)

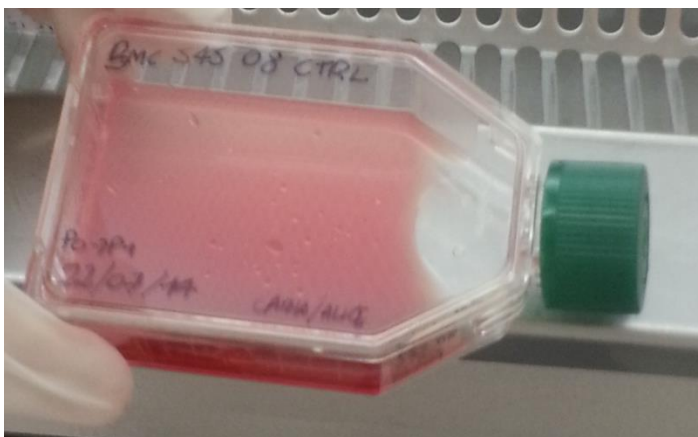


Figura 2.3.4 Piastratura della sospensione cellulare nella flask T25.

Dopo 7 giorni, tempo necessario alle cellule staminali mesenchimali per aderire al fondo della T25, viene effettuato il primo cambio mezzo che prevede i seguenti passaggi:

- Aspirazione del mezzo di coltura;
- Inserimento di 5 mL di mezzo nella T25;
- Aggiunta di 50 μ L di FGF.

Si osservano le cellule al microscopio, per verificarne la crescita e valutarne la confluenza, parametro che indica la percentuale di superficie della flask ricoperta da cellule. Dopo il primo cambio mezzo ogni 4 giorni viene effettuato un ulteriore cambio mezzo e si mantiene questa procedura fino a che il campione non raggiunge una confluenza intorno all'80%.

A causa della grande variabilità che si osserva nella crescita delle cellule nei diversi campioni si è deciso di staccare le cellule dalla T25 una volta raggiunta la confluenza dell'80% del singolo campione. Questa decisione ha come conseguenza il fatto che i tempi di coltura varieranno da campione a campione. Nonostante ciò si è adottata questa scelta poiché, non conoscendo a priori la differenza di crescita dei vari campioni, impostando un numero prefissato di giorni di coltura si sarebbe corso il rischio di non avere abbastanza cellule per poter condurre le prove successive nei campioni a crescita più lenta; viceversa per i campioni a crescita più veloce si sarebbe corso il rischio di far soffrire cellule troppo confluenti, con conseguente perdita di parte del campione. Al fine di confrontare la resa cellulare tra i diversi protocolli di isolamento si è perciò calcolato un indice che tiene conto del tempo che le cellule hanno impiegato per arrivare a confluenza. La formula di tale indice è

$$R = \frac{N_{\text{cell P1}}}{V_{\text{midollo}} * t}$$

dove $N_{\text{cell P1}}$ è il numero di cellule che vengono contate dopo essere state staccate dalla T25 (cellule al passaggio 1), V_{midollo} è il volume di midollo iniziale, t è il numero di giorni che intercorrono tra quando le cellule vengono piastrate a quando vengono staccate.

Una volta verificata la confluenza delle cellule a microscopio, la procedura seguita per staccare le cellule dalla flask prevede:

- Rimozione del mezzo di coltura dalla T25;
- Lavaggio delle cellule con PBS;
- Rimozione del PBS;
- Inserimento di 1 mL di Tripsina a 37 °C (la Tripsina permette di staccare le cellule dalla flask) ;

- Incubazione della flask a 37 °C e 5% CO₂ per 3 minuti;
- Inserimento di 1 mL di mezzo di coltura delle MSCs nella T25 per disattivare la Tripsina e inserimento della soluzione in un tubo da centrifuga da 50 mL;
- Sciacquo della T25 con PBS per rimuovere eventuali cellule rimaste adese alla flask e inserimento della soluzione nel tubo da centrifuga;
- Centrifugazione della sospensione cellulare a 1400g per 5 minuti;
- Aspirazione del surnatante e risospensione delle cellule in 2 mL di mezzo;
- Conta.

Una volta staccate le cellule vengono utilizzate per le prove di colonialità e differenziamento osteogenico e adipogenico. La parte restante di cellule staccate dalla flask T25 dopo la confluenza, che non viene utilizzata per tali esperimenti, viene piastrata con una densità cellulare di circa 3000 cellule/cm² e viene mantenuta in coltura con mezzo completo delle MSCs più FGF e riposta nell'incubatore.

Quando le cellule raggiungono la confluenza vengono staccate, contate e congelate. Il congelamento delle cellule prevede che queste vengano conservate in azoto liquido in contenitori criogenici.

2.3.2 Valutazione dei parametri di colonialità e differenziamento

Al fine di valutare le caratteristiche biologiche di base delle cellule mesenchimali nel midollo osseo si effettuano esperimenti in vitro, che vanno a sondare la possibilità di formazione di colonie e la capacità di differenziamento in osso, grasso e cartilagine di queste cellule. [Di Girolamo et al.,1999] [Chamberlain et al.,2007]

Colonialità

Per colonialità si intende la capacità delle cellule di formare colonie, dove una colonia è definita come un aggregato di cellule che derivano da uno stesso progenitore. La conta delle CFU (colony-forming unit) può essere utilizzata sia in campo microbiologico per stimare il numero di batteri e funghi presenti in un campione, sia per valutare la potenzialità delle cellule, nel caso in esame mesenchimali, di formare colonie in base a specifiche condizioni di nutrimento, temperatura e tempo. L'esperimento per la conta delle CFU prevede la piastratura del campione in pozzetti secondo parametri di diluizione specifici, in modo che sul singolo pozzetto si semini un numero definito di cellule al centimetro quadro. Una volta piastrate le cellule e diluite nel mezzo di nutrimento opportuno queste si attaccheranno al fondo del pozzetto e potranno dare origine a

colonie. La formazione di queste ultime verrà in seguito valutata tramite la colorazione con una soluzione di colorante Crystal Violet. Una colonia verrà considerata tale se contiene almeno un gruppo di venti cellule. Le colonie vengono contate manualmente e si calcola successivamente la percentuale di cellule che hanno formato colonie rispetto al numero di cellule piastrate in totale. Con tale esperimento è possibile indagare perciò la staminalità del campione.

Per gli esperimenti condotti in questo studio si è scelto di seminare le cellule in tre pozzetti da circa 10 cm² di una piastra Multiwell da 6 con tre diverse densità: 3 cellule/cm², 6 cellule/cm² e 12 cellule/cm². A questo scopo il campione dopo la conta viene diluito con la quantità di mezzo necessario per ottenere la densità voluta. Una volta seminate le cellule il campione viene mantenuto in coltura nell'incubatore per 7 giorni con 2 mL di CM con FBS (Fetal Bovine Serum) al 20%, dopodiché viene effettuato il primo cambio mezzo e dopo ulteriori 7 giorni viene effettuato il saggio con la colorazione Crystal Violet seguendo il protocollo in Appendice 2. (Figura 2.3.5)



Figura 2.3.5 In sequenza partendo da sinistra: coltura, colorazione con Crystal Violet e ottenimento dei risultati di colonialità.

Differenziamento

Per differenziamento cellulare si intende la capacità di una cellula progenitrice non specializzata di evolvere in una cellula matura o differenziata, ovvero specifica di un determinato tessuto del corpo umano. E' noto dalla letteratura che le cellule staminali mesenchimali possono differenziare sotto opportune condizioni in vitro in cellule dell'osso, del grasso e della cartilagine. [Park et al.,1999] [Kuznetsov et al.,2001] Per valutare in vitro il differenziamento quello che generalmente si fa è piastrare le cellule in pozzetti e metterle in coltura per alcuni giorni in un opportuno mezzo che induca il differenziamento verso uno specifico tipo di cellule. In particolare in questo lavoro si è valutato il differenziamento osteogenico e adipogenico delle cellule mesenchimali provenienti dai campioni di midollo osseo analizzati.

Differenziamento osteogenico

Per il differenziamento osseo il mezzo di coltura utilizzato prevede, in particolare, la presenza di tre fattori di induzione fondamentali: desametasone, β -glicerofosfato e acido ascorbico. La

composizione del mezzo di coltura osteogenico è descritta nel dettaglio in Appendice 3. I tempi di coltura necessari per il differenziamento vanno dai 14 ai 20 giorni.

Il differenziamento osteogenico prevede che le cellule vengano seminate con la densità di 1500 cellule/cm². Nell'esperimento seguito si decide di seminare con tale densità sei pozzetti di una Multiwell da 24 per ogni campione: tre di questi verranno trattati con mezzo di differenziamento osteogenico, tre verranno trattati con il normale mezzo di coltura delle MSCs e saranno il controllo della prova. Si è scelto di mantenere in coltura tre pozzetti per ogni caso al fine di ridurre l'influenza di eventuali errori commessi nella procedura. Il protocollo di differenziamento osteogenico prevede che ogni 3/4 giorni venga effettuato il cambio mezzo. Durante il cambio mezzo viene aspirato il mezzo di coltura e ai pozzetti che si vogliono far differenziare viene aggiunto 1 mL di mezzo osteogenico (Figura 2.3.6); agli altri tre pozzetti viene aggiunto 1 mL di normale mezzo delle MSCs con 10 µL di FGF. Dopo 14 giorni viene fermata la coltura e viene effettuato il saggio con colorazione Alizarin Red-S (ARS), che evidenzia i depositi di calcio prodotti dalle cellule differenziate, come da protocollo in Appendice 4. (Figura 2.3.7)



Figura 2.3.6 Cambio del mezzo osteogenico ai tre pozzetti di un campione.

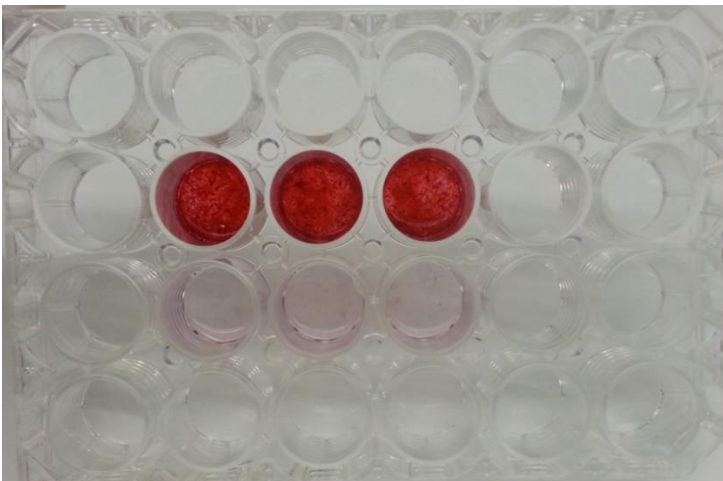


Figura 2.3.7 Colorazione con Alzarin Red-S.

Terminata la colorazione vengono acquisite delle immagini utilizzando il microscopio OLYMPUS collegato a un pc tramite l'uso del programma CELL[^]F. Si usa lo stesso set up per microscopio in campo chiaro e uno stesso ingrandimento per tutti i campioni in modo da poter confrontare qualitativamente le foto scattate. (Figura 2.3.8)

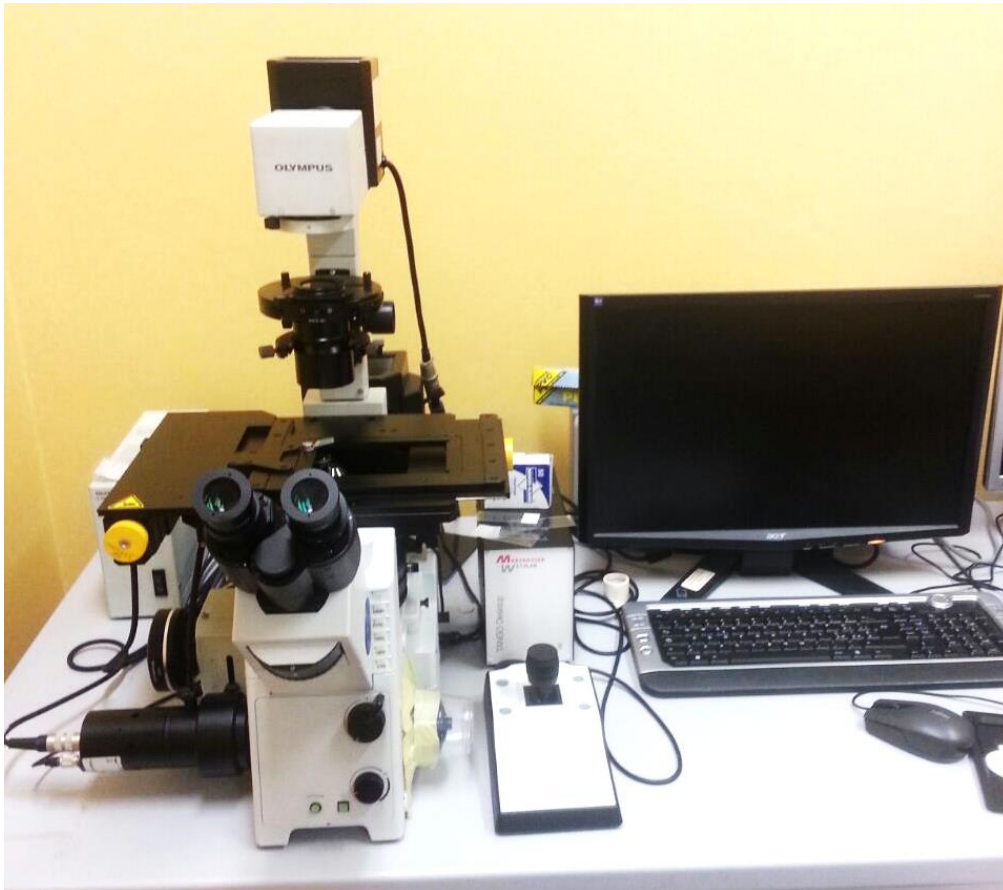


Figura 2.3.8 Microscopio e set up per acquisire le immagini dei campioni.

Successivamente si effettua l'estrazione dei pozzetti colorati in CPC (Cetylpyridinium Chloride 10%) come da protocollo (Appendice 4) e per ogni pozzetto di ogni campione vengono letti i risultati in duplicato inserendo in ogni pozzetto di una Multiwell da 96 100 μ L di soluzione. (Figura 2.3.9) L'estrazione dei risultati prevede l'utilizzo dello spettrofotometro, strumento che permette di leggere il parametro di assorbanza, cioè l'assorbimento di luce da parte del campione presente nei pozzetti. Il valore di assorbanza letto è indice della quantità di depositi di calcio prodotti dalle cellule e, quindi, di quanto il campione si sia differenziato e può essere utilizzato per confrontare i risultati provenienti da diversi campioni. Nel caso di colorazione con ARS la lettura dell'assorbanza è impostata con lunghezza d'onda di 570nm.

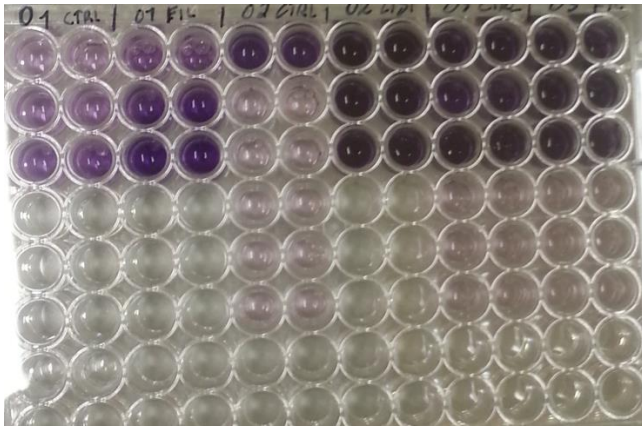


Figura 2.3.9 Piastra Multiwell da 96 pozzetti usata per l'estrazione dei risultati successivamente alla colorazione. I risultati di ogni pozzetto vengono letti in duplicato.

Differenziamento adipogenico

Il differenziamento adipogenico si caratterizza per la presenza nel mezzo di coltura di fattori di induzione quali desametasone, indometacina, insulina e isobutil-1-metilxantina (IBMX). Il mezzo di coltura adipogenico è di due tipi: di mantenimento o di induzione. La loro composizione è descritta nel dettaglio in Appendice 5.

L'esperimento prevede che le cellule vengano seminate in pozzetti con la densità di 3000 cellule/cm². Il primo e il terzo cambio mezzo vengono effettuati con mezzo adipogenico induttivo, mentre il secondo e il quarto cambio mezzo vengono effettuati con mezzo adipogenico di mantenimento. Dopo 14 giorni viene realizzato il saggio di colorazione con Oil Red, che evidenzia i vacuoli di grasso presenti nelle cellule che si sono differenziate, seguendo il protocollo in Appendice 6. (Figura 2.3.10) Si acquisiscono alcune immagini di ogni pozzetto utilizzando un set up per microscopio in campo chiaro e lo stesso ingrandimento per tutti i campioni. L'estrazione è fatta in isopropanolo al 100% come da protocollo e per ogni pozzetto di ogni campione i risultati vengono estratti in duplicato inserendo in ogni pozzetto di una piastra Multiwell da 96 150µL di soluzione. Per la lettura allo spettrofotometro si legge l'assorbanza con una lunghezza d'onda di 490nm.

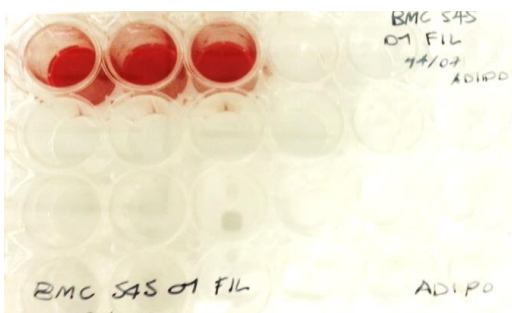


Figura 2.3.10 Colorazione con Oil Red dei pozzetti di un campione.

2.3.4 Analisi statistica

Al fine di effettuare un'analisi statistica dei dati si è deciso di prendere in analisi i campioni di midollo osseo di otto pazienti. Un procedimento rigoroso richiederebbe il confronto dei tre protocolli (Standard, Lisi e Filtrato) su ogni campione, tuttavia poiché il volume di midollo proveniente dalla sala operatoria è limitato quattro campioni sono stati sottoposti ai protocolli Standard e Filtrato, quattro ai protocolli Standard e Lisi. Il fatto che il confronto tra protocollo Standard e protocolli diversi sia fatto sullo stesso paziente rende i risultati affidabili. (Tabella 2.3.1)

Codice	Protocollo	Anno di nascita	Sesso
01	Standard/Filtrato	1969	M
02	Standard/Lisato	1951	F
03	Standard/Filtrato	1934	F
04	Standard/Lisato	1927	F
05	Standard/Filtrato	1941	M
06	Standard/Lisato	1971	M
07	Standard/Filtrato	1969	F
08	Standard/Lisato	1935	F

Tabella 2.3.1 Codice, protocolli seguiti, anno di nascita e sesso dei campioni presi in esame.

Il gruppo dei quattro pazienti scelti per il confronto tra il protocollo Standard e Filtrato ha un'età di 62.5 ± 17.5 anni con la presenza di due uomini e due donne, mentre il gruppo dei quattro pazienti scelti per il confronto tra il protocollo Standard e Lisi ha un'età di 65 ± 22 anni con la presenza di un uomo e tre donne.

I risultati numerici ottenuti dai dati del campione e dagli esperimenti di colonialità e differenziamento osteogenico e adipogenico vengono trattati con un'analisi statistica utilizzando il programma Prism Graph Pad. Poiché i dati analizzati presentano una grande variabilità da paziente a paziente si è deciso di utilizzare il metodo del T-test accoppiato per misure ripetute a due code. Questo test, infatti, è uno strumento valido per confronto tra la medie delle differenze di due campioni dipendenti.

L'analisi statistica ha lo scopo di provare se c'è differenza statisticamente significativa tra i campioni trattati con procedura standard e filtrata e tra i campioni trattati con procedura standard e lisata in termini di:

- Resa
- Colonialità

- Differenziamento adipogenico
- Differenziamento osteogenico

Inoltre, sempre con il metodo del T-test accoppiato per misure ripetute a due code, si è andato a verificare se esistono differenze statisticamente significative tra i pozzetti trattati con mezzo di differenziamento adipogenico e osteogenico e i rispettivi pozzetti di controllo trattati con mezzo di coltura delle MSCs. Il fine di questo test è quello di verificare che il differenziamento sia avvenuto in maniera statisticamente significativa.

Per rendere ancora più approfondita l'analisi delle differenze tra i vari campioni viene anche condotto un test statistico Anova, che permette di confrontare contemporaneamente i dati dei protocolli standard, lisi e filtrato. Tale test, infatti, permette di confrontare le medie tra più di due gruppi.

In queste analisi l'intervallo di confidenza scelto è del 95 %.

Per la colonialità il dato utilizzato per i vari campioni è stato la media delle percentuali di CFU contate rispetto alle cellule seminate per i tre pozzetti. Per il differenziamento, invece, viene effettuata prima una media tra le due misure di assorbanza provenienti dallo stesso pozzetto e successivamente viene effettuata la media tra i tre pozzetti di uno stesso campione che hanno subito lo stesso trattamento.

2.4 Risultati

2.4.1 Caratteristiche del campione trattato

All'arrivo del campione è possibile contare le cellule presenti e ricavare dati riguardanti la morfologia delle cellule contate. In particolar modo ci si sofferma sul parametro del diametro cellulare, per comprendere quali possibili tipologie cellulari sono presenti all'interno del campione e per poter calcolare la percentuale di cellule mononucleate (escludendo quindi globuli rossi e detriti) contenute nel campione rispetto al numero totale. I calcoli delle percentuali sono indicativi in quanto verranno considerate come cellule le particelle con diametro maggiore o uguale a 5 μm e cellule mononucleate tutte quelle cellule che hanno diametro compreso tra 10 e 27 μm . Inoltre potrebbero essere presenti degli agglomerati di cellule più piccole che lo strumento legge come un'unica cellula. Si riportano di seguito, a titolo di esempio, gli istogrammi delle frequenze relative dei diametri cellulari di alcuni dei campioni, mettendo in risalto il confronto tra il protocollo Standard (Std), quello Filtrato (fil) e quello di Lisi (lisi).

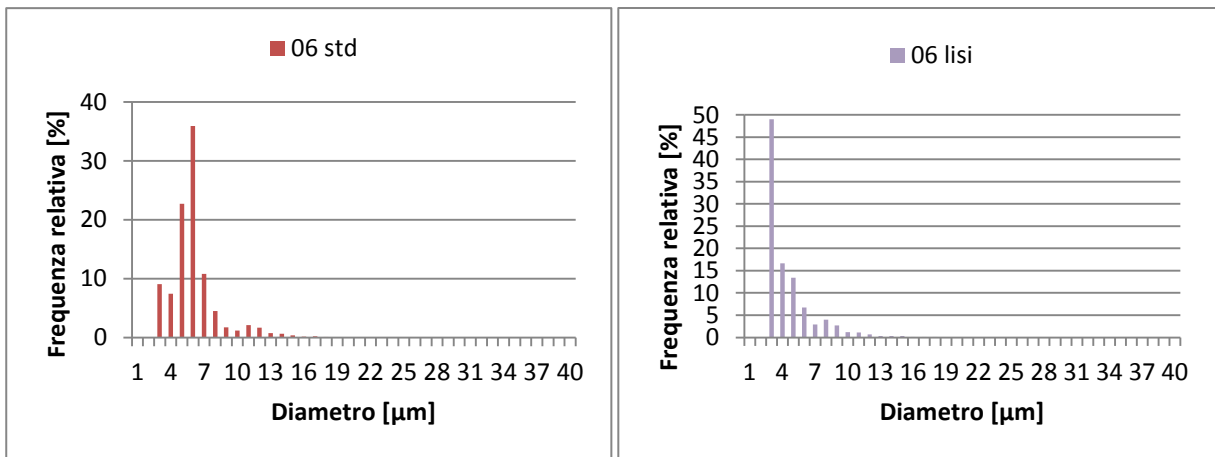


Figura 2.4.1 Istogrammi delle frequenze relative dei diametri cellulari del campione 06 trattato con protocollo Standard (a sinistra) e con protocollo di lisi (a destra).

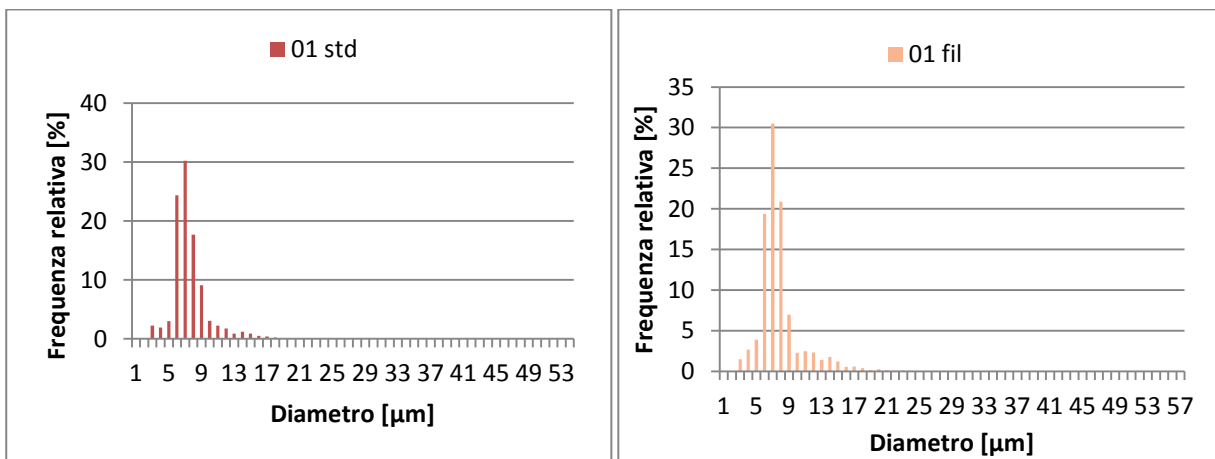


Figura 2.4.2 Istogrammi delle frequenze relative dei diametri cellulari del campione 01 trattato con protocollo Standard (a sinistra) e con protocollo di filtrato (a destra).

Dalle figure è possibile notare che la distribuzione della composizione del campione è simile se si confrontano protocollo Standard e Filtrato, mentre differisce tra protocollo Standard e di Lisi. Il grafico del campione trattato con il protocollo di Lisi presenta dei picchi di frequenza relativa in corrispondenza di un diametro cellulare inferiore, da imputare alla presenza dei detriti creati dalla rottura dei globuli rossi.

L'analisi di questi dati, seppur indicativa, è utile per effettuare una prima stima approssimativa della popolazione cellulare del campione nel suo complesso.

In tabella 2.4.1 viene riportata la percentuale di cellule con diametro compreso tra i 10 μm e 27 μm rispetto al numero di cellule totali nei vari campioni trattati e nel grafico 2.4.3 è riportato il grafico che mostra la media e deviazione standard delle percentuali rilevate per ogni protocollo testato.

	percentuale di cellule con diametro compreso tra 10 μm e 27 μm [%]
01 std	8.78
01 fil	12.88
02 std	8.96
02 lisi	9.76
03 std	11.27
03fil	15.67
04 std	3.5
04lisi	11.62
05 std	14.18
05 fil	12.78
06 std	7.68
06 lisi	9.8
07 std	7.77
07 fil	6.98
08 std	4.87
08 lisi	7.61

Tabella 2.4.1 Percentuale delle cellule mononucleate sul totale delle cellule nei vari campioni.

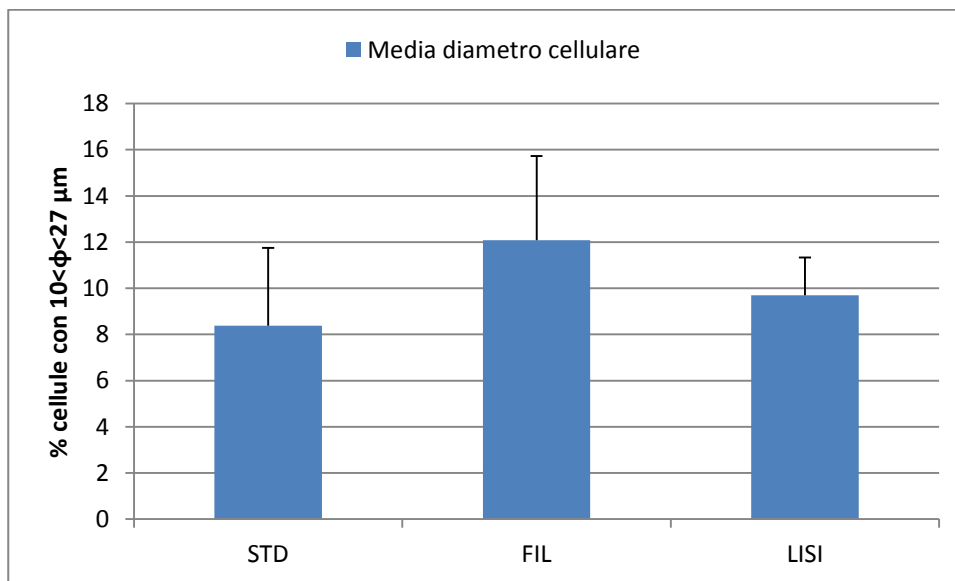


Figura 2.4.3 Grafico della media del diametro cellulare per il protocollo standard (STD), filtrato (FIL) e lisi (LISI).

Effettuando il test statistico ANOVA sui dati percentuali di cellule con diametro compreso tra 10 μm e 27 μm per i vari protocolli si evince che non c'è differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi (Standard, Filtrato e Lisi); il P_Value risulta infatti di 0.1944 ($\gg 0.05$).

2.4.2 Resa

Come riportato nel capitolo Materiali e Metodi per la resa cellulare viene utilizzata la seguente formula:

$$R = \frac{N_{cell\ P1}}{V_{midollo} * t}$$

In tabella 2.4.2 viene riportato il valore di ogni parametro per i vari campioni

Campione	Volume midollo [mL]	T espansione [giorni]	N cellule P1	Resa [cellule/mL*gg]
01 std	0.9	13	9.54 10 ⁵	81 538
01 fil	0.9	18	17.34 10 ⁵	113 333
02 std	1.2	21	2.14 10 ⁵	8 496
02 lisi	1.2	14	3.66 10 ⁵	21 785
03 std	0.6	15	2.6 10 ⁵	28 889
03 fil	0.6	15	4.12 10 ⁵	45 777
04 std	0.25	12	4.48 10 ⁵	156 000
04 lisi	0.25	10	4.34 10 ⁵	173 600
05 std	2.4	14	8.14 10 ⁵	24 226
05 fil	2.4	14	5.8 10 ⁵	17 261
06 std	1.1	12	6.22 10 ⁵	47 121
06 lisi	1.1	12	4.98 10 ⁵	37 727
07 std	1.0	13	6.46 10 ⁵	49 692
07 fil	1.0	13	3.5 10 ⁵	26 923
08 std	1.25	14	10 10 ⁵	57 143
08 lisi	1.25	14	20 10 ⁵	114 286

Tabella 2.4.2 Volume del midollo, tempo di espansione, numero di cellule a P1 e Resa per i vari campioni.

Dai grafici in figura 2.4.4 e 2.4.5 si nota come la resa vari molto da paziente a paziente, ma all'interno del singolo campione le differenze tra i protocolli non sono marcate e non hanno un unico trend.

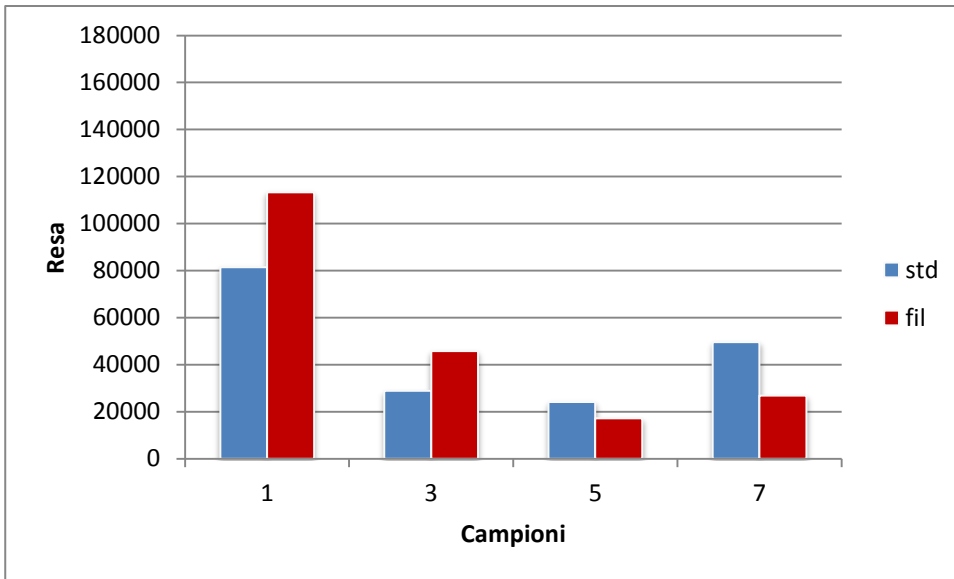


Figura 2.4.1 Resa cellulare dei campioni 1, 3, 5 e 7 trattati con protocollo Standard (azzurro) e Filtrato (rosso).

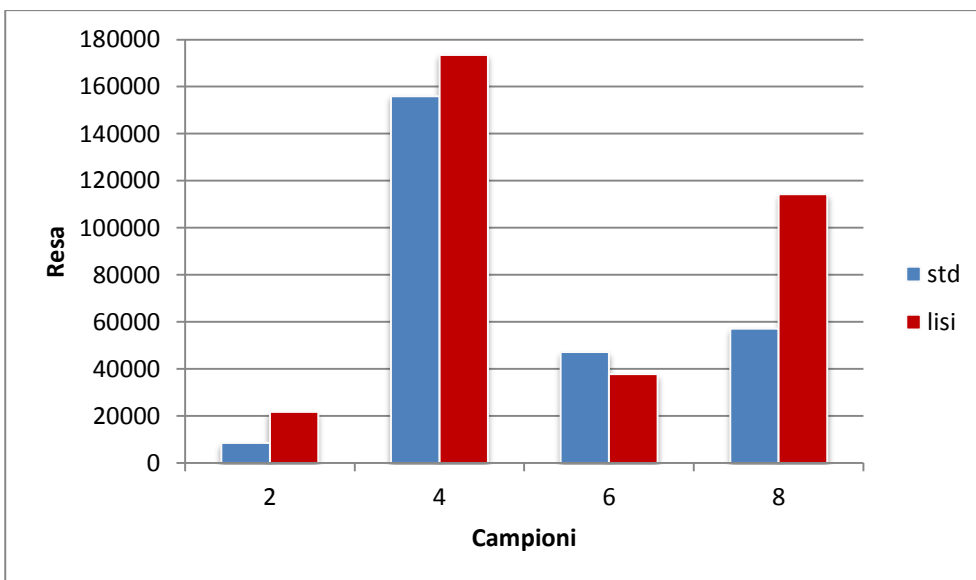


Figura 2.4.2 Resa cellulare dei campioni 2, 4, 6 e 8 trattati con protocollo Standard (azzurro) e di Lisi (rosso).

L'analisi statistica conferma queste osservazioni, infatti dal t-test accoppiato per misure ripetute non emerge differenza significativa tra i dati dei campioni sottoposti a protocolli differenti. (P_value del t_test Standard/Filtrato 0.7228 e del t_test Standard/Lisato 0.2502).

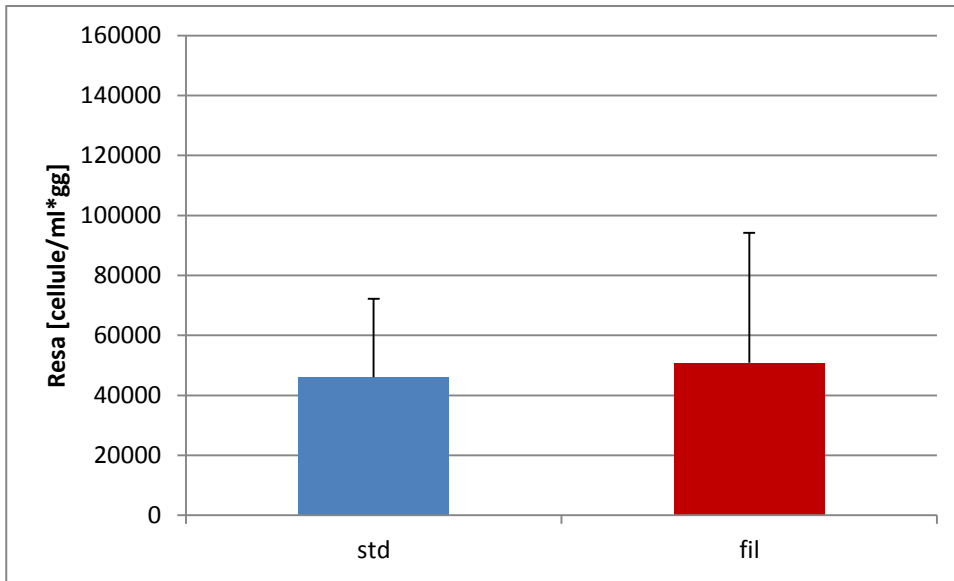


Figura 2.4.3 Istogramma con media e deviazione della resa cellulare per i campioni trattati con protocollo Standard (STD) e Filtrato (FIL).

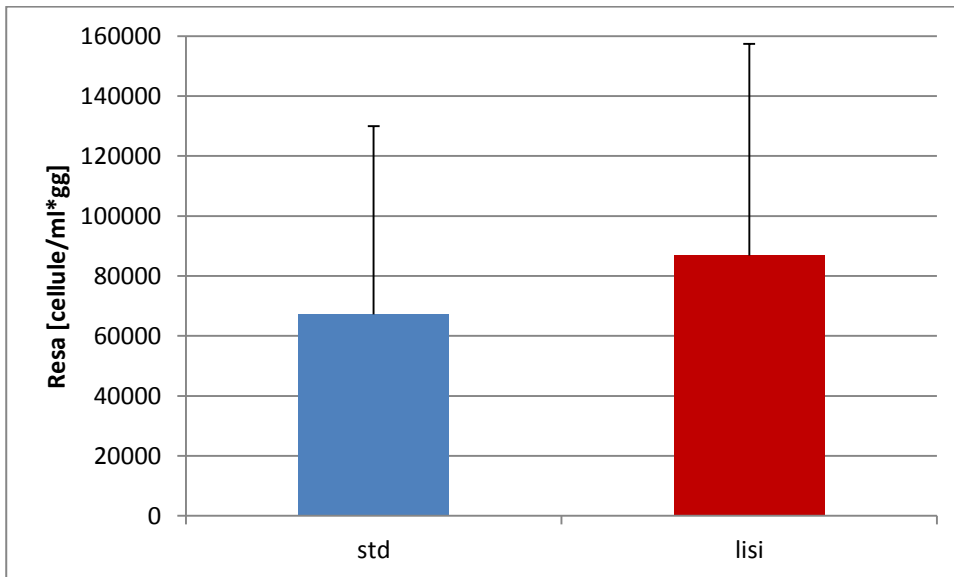


Figura 2.4.4 Istogramma con media e deviazione della resa cellulare per i campioni trattati con protocollo Standard (STD) e di Lisi (LISI).

Il test ANOVA, che permette di confrontare contemporaneamente i tre protocolli, dà come risultato un P-Value di 0.3646, statisticamente non significativo. Non vi è quindi alcuna differenza statisticamente significativa nella resa tra i tre trattamenti, tuttavia è possibile notare la presenza di un trend: il protocollo di lisi ha una resa superiore agli altri due protocolli.

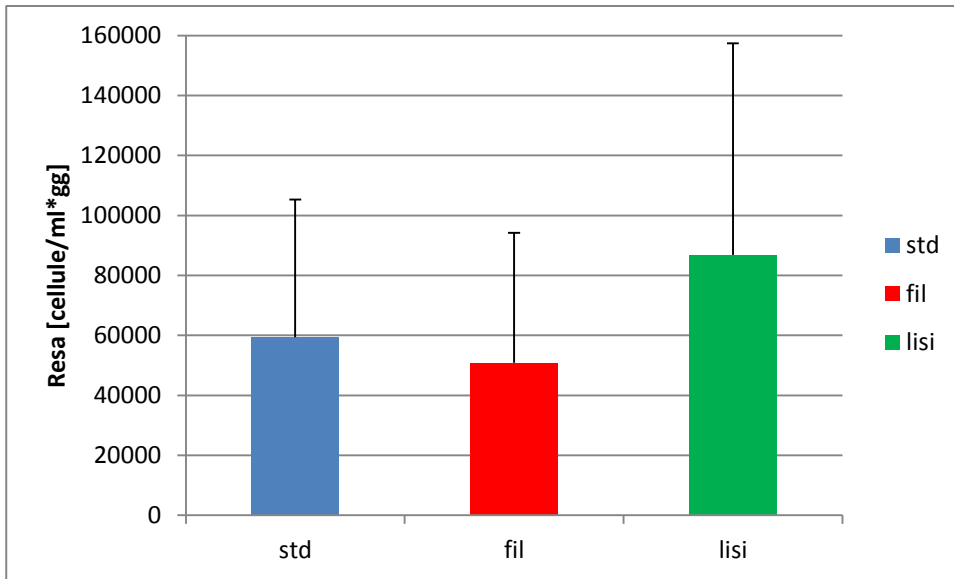


Figura 2.4.5 Istogramma con resa e deviazione della resa cellulare per i campioni trattati con protocollo Standard (STD), di Lisi (LIS) e Filtrato (FIL).

2.4.3 Colonialità

Dagli esperimenti di colonialità si è osservato che tutti i campioni sottoposti ai tre trattamenti hanno creato delle colonie. Il conteggio delle colonie nei diversi pozzetti è stato effettuato manualmente e ha permesso di ricavare la percentuale di colonie formate rispetto al numero totale di cellule seminate. Poiché nel terzo pozzetto erano presenti troppe colonie, spesso sovrapposte, mentre nel primo pozzetto spesso le colonie erano poco distinguibili si è deciso per tutti i campioni di contare le colonie del secondo pozzetto seminato con densità di 6 cellule/ cm^2 . In figura 2.4.9 si riportano due esempi di campioni trattati rispettivamente con procedura standard e filtrata e standard e lisata.

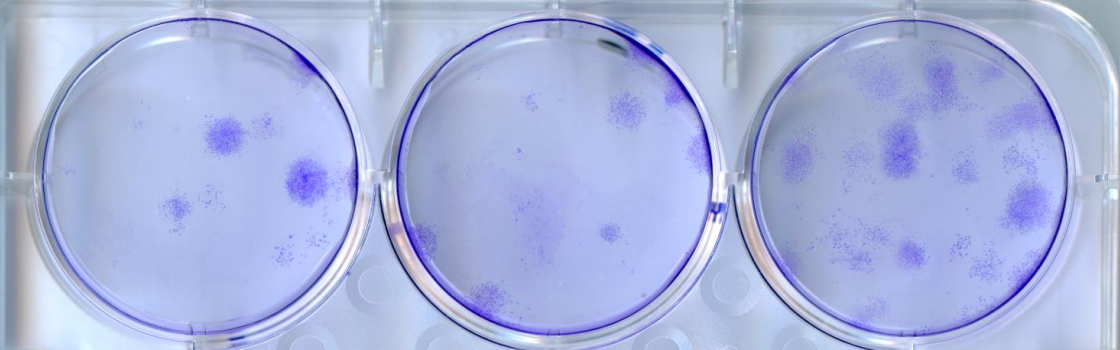

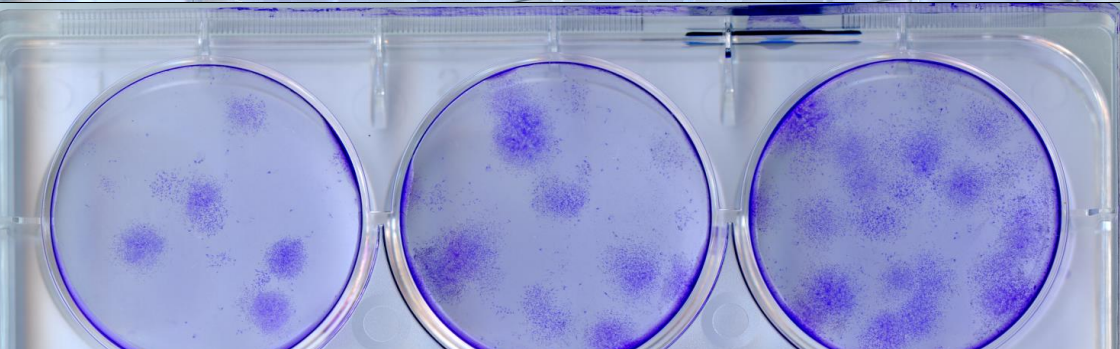
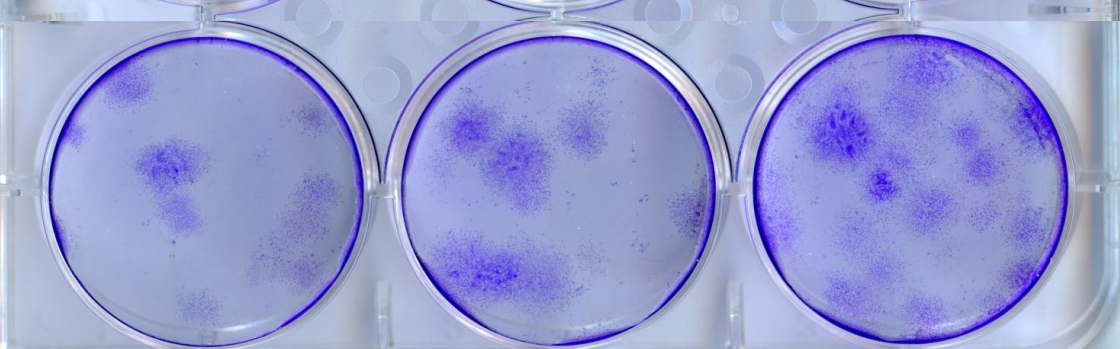
Campione	Pozzetti delle CFU [3 cellule\ cm^2 ; 6 cellule\ cm^2 ; 12 cellule\ cm^2]
05 STD	
05 FIL	
08 STD	
08 LISI	

Figura 2.4.6 Immagini dei pozzetti CFU del campione 05 trattato con protocollo Standard (05 STD) e Filtrato (05 FIL) in alto. Immagini dei pozzetti CFU del campione 08 trattato con protocollo Standard (08 STD) e di Lisi (08 LISI) in basso.

In tabella 2.4.3 vengono riportate le percentuali contate di colonie per i vari campioni e trattamenti.

Campioni:	CFU (%)
1 STD	26.6
1 FIL	31.5
2 STD	16.7
2 LISI	23.3
3 STD	25.5
3 FIL	12.8
4 STD	18.5
4 LISI	35
5 STD	26.7
5 FIL	36.7
6 STD	60
6 LISI	43.3
7 STD	60
7FIL	46.6
8 STD	33.3
8 LISI	37.4

Tabella 2.4.3 Percentuale di colonie contate per i vari campioni.

L'analisi statistica, effettuata tramite un t-test accoppiato per misure ripetute, evidenzia come non ci sia differenza statisticamente significativa tra protocollo standard e filtrato ($P_{\text{value}}=0.6731$) e tra protocollo standard e lisato ($P_{\text{value}}=0.7317$).

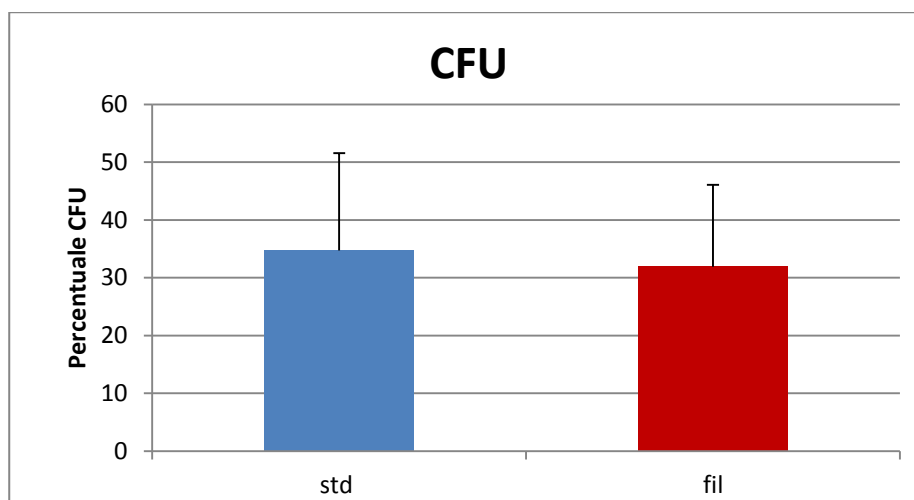


Figura 2.4.7 Istogramma con media e deviazione della percentuale di CFU per i campioni trattati con protocollo Standard (STD) e Filtrato (FIL).

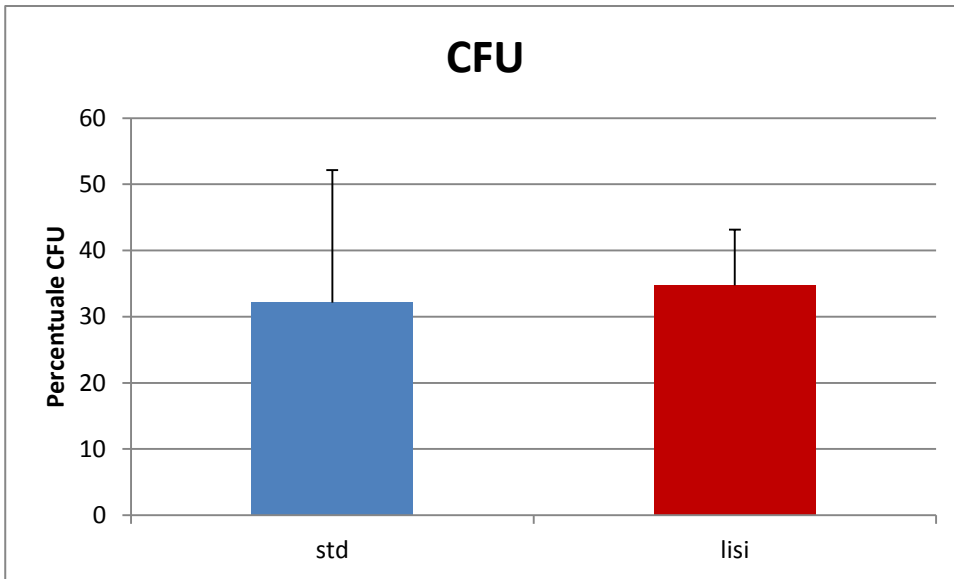


Figura 2.4.8 Istogramma con media e deviazione della percentuale di CFU per i campioni trattati con protocollo Standard (STD) e di Lisi (LISI).

Anche il test statistico ANOVA indica che non c'è differenza significativa tra i tre protocolli per quanto riguarda la colonialità. (P_value=0.9641)

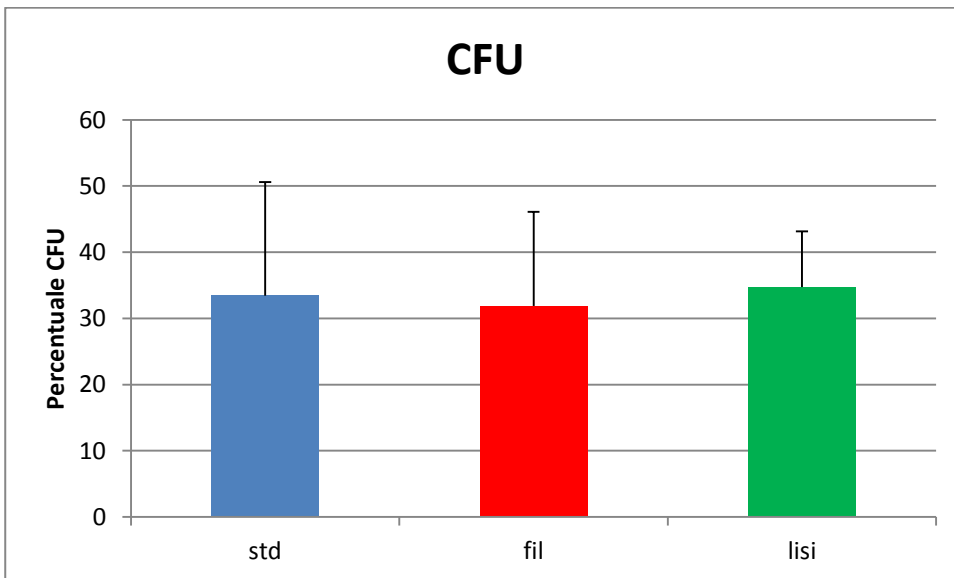


Figura 2.4.9 Istogramma con media e deviazione della percentuale di CFU per i campioni trattati con protocollo Standard (STD), di Lisi (LISI) e Filtrato (FIL).

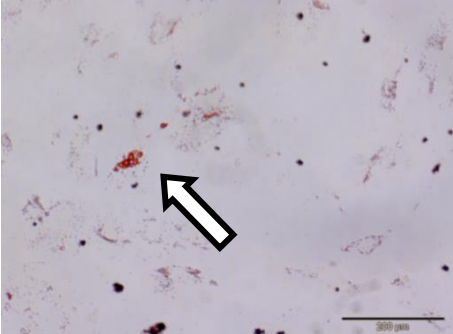
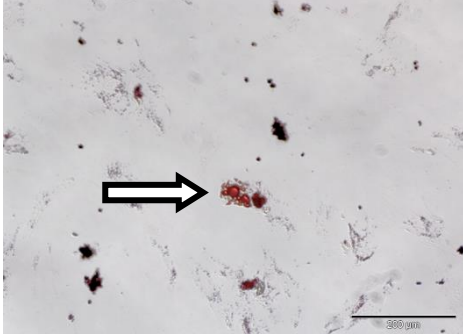
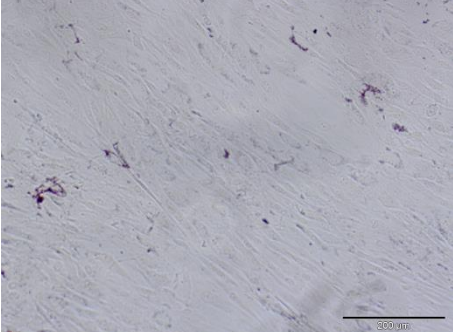
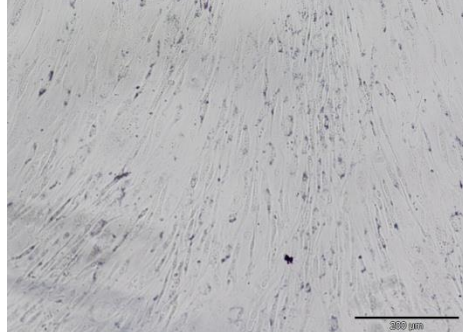
2.4.4. Differenziamento

Differenziamento adipogenico

In Tabella 2.4.4 vengono mostrate le immagini acquisite al microscopio dei pozzetti dopo la colorazione con Oil Red per i codici di due pazienti. Leggendo la tabella orizzontalmente si ha il confronto tra l'immagine di un pozzetto del campione trattato con protocollo Standard e l'immagine

di un pozzetto del campione trattato con protocollo Filtrato. Leggendo la tabella in senso verticale si ha un confronto tra i pozzetti trattati con mezzo di differenziamento adipogenico e quelli trattati con mezzo base relativi allo stesso codice trattato con lo stesso protocollo.

Paziente 1

Standard	Filtrato	
		Adipo
		Controllo

Paziente 2

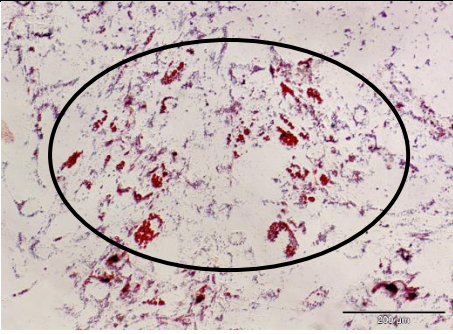
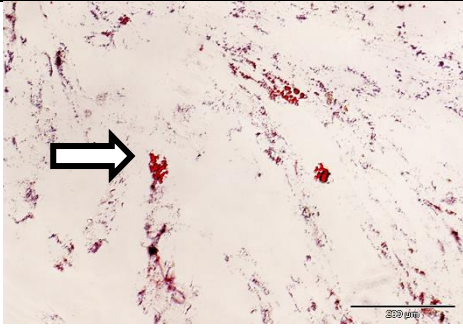
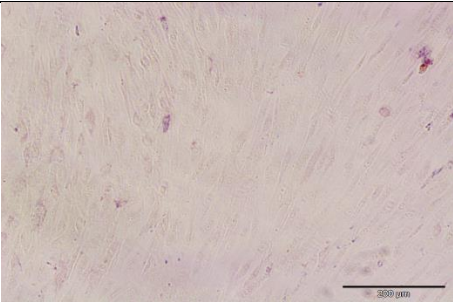
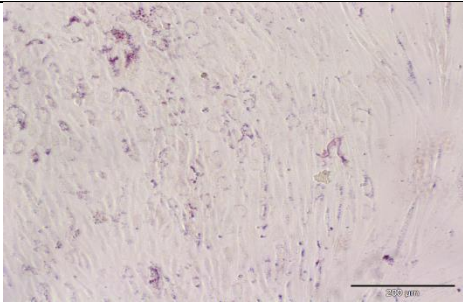
Standard	Filtrato	
		Adipo
		Controllo

Tabella 2.4.4 Immagini al microscopio dei pozzetti dopo colorazione Oil Red di due pazienti (rispettivamente codici 03 e 07). In alto: pozzetti mantenuti in coltura con mezzo di differenziamento adipogenico del campione trattato con protocollo Standard (a sinistra) e Filtrato (a destra). In basso: pozzetti mantenuti in coltura con mezzo base delle MSCs del campione trattato con protocollo Standard (a sinistra) e Filtrato (a destra). Le frecce bianche indicano la presenza dei vacuoli di grasso.

Lo scopo delle immagini è quello di dare un'idea qualitativa del differenziamento adipogenico. Nei pozzetti trattati con mezzo adipogenico è possibile riscontrare la presenza in entrambi i pazienti di vacuoli di grasso evidenziati dalla colorazione Oil Red (segnalati nelle immagini dalle frecce); questi non sono invece presenti nei pozzetti di controllo. Dall'analisi qualitativa delle immagini non emerge una differenza evidente tra i due protocolli (Standard e Filtrato) nei due pazienti. Passando all'analisi quantitativa dei dati dell'estrazione, nel grafico di figura 2.4.13 è possibile confrontare le medie e deviazioni standard dei valori di assorbanza dei due protocolli (Standard e Filtrato) per ogni campione.

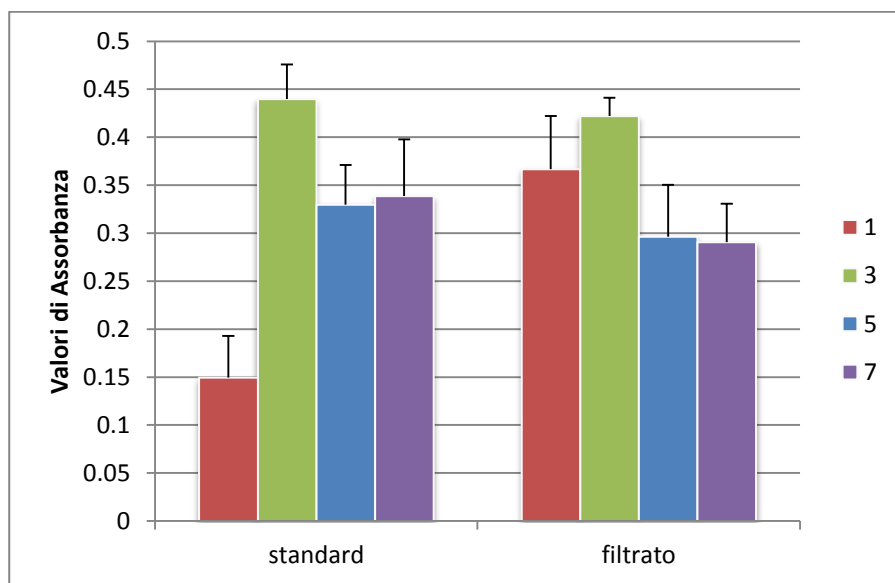


Figura 2.4.10 Grafici con media e deviazione standard dei valori di assorbanza dei pozzetti sottoposti a differenziamento adipogenico dei campioni 1, 3, 5 e 7 trattati con protocolli standard e filtrato.

L'analisi statistica conferma le osservazioni qualitative, infatti non emerge dal T-test differenza statisticamente significativa dei dati di assorbanza tra i campioni trattati con protocollo Standard (STD) e Filtrato. (P_value 0.6711).

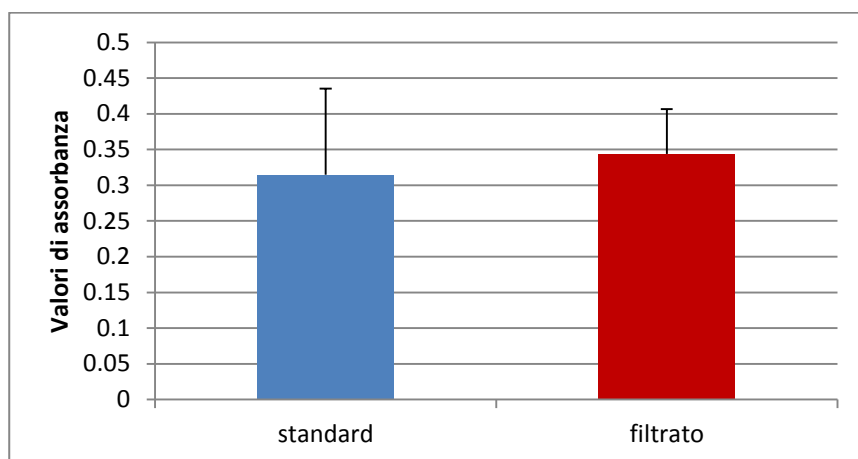
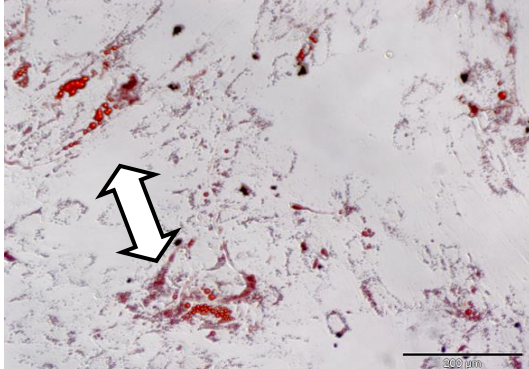
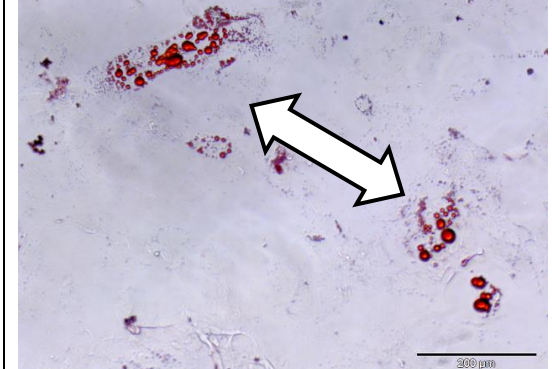
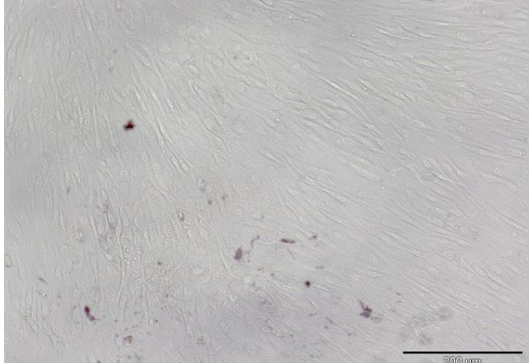
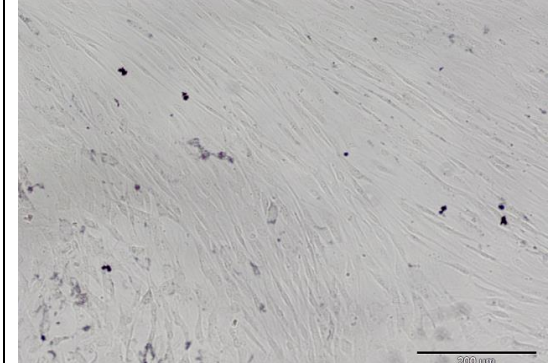


Figura 2.4.11 Istogrammi con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni trattati con protocollo Standard (STD) e Filtrato (FIL).

In tabella 2.4.5 vengono mostrate le immagini di confronto tra il protocollo Standard e Lisi e tra il trattamento adipo e base di due pazienti.

Paziente 1

Standard	Lisi	
		Adipo
		Controllo

Paziente 2

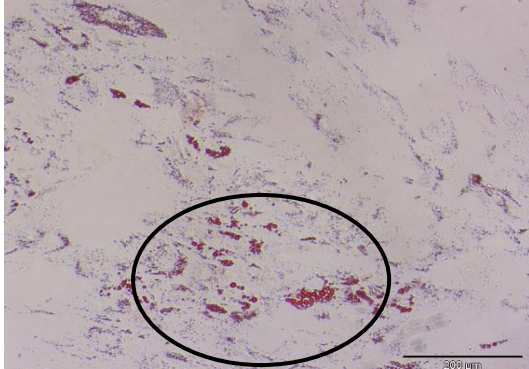
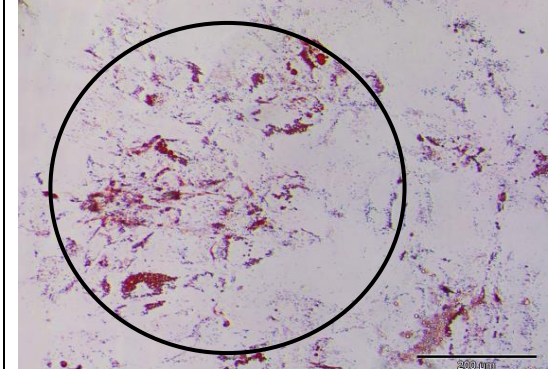
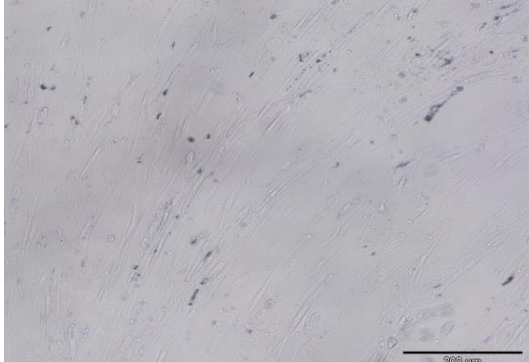
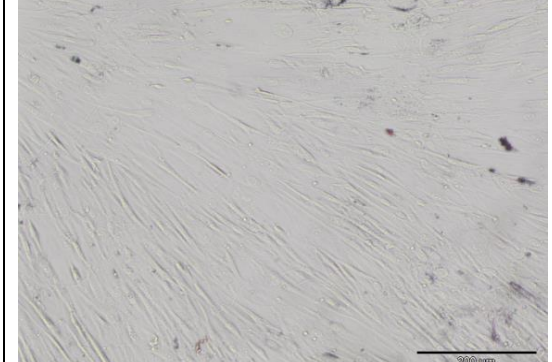
Standard	Lisi	
		Adipo
		Controllo

Tabella 2.4.5 Immagini al microscopio dei pozzetti dopo colorazione Oil Red di due pazienti (rispettivamente codici 04 e 08). In alto: pozzetti mantenuti in coltura con mezzo di differenziamento adipo del campione trattato con protocollo Standard (a

sinistra) e di Lisi (a destra). In basso: pozzetti mantenuti in coltura con mezzo base delle MSCs del campione trattato con protocollo Standard (a sinistra) e di Lisi (a destra). La frecce bianche indicano la presenza dei vacuoli di grasso.

Anche in questo caso l'analisi qualitativa delle immagini non mostra differenza tra i due protocolli, mentre si può notare come i vacuoli siano presenti solo nei pozzetti trattati con mezzo di differenziamento adipogenico.

Passando all'analisi quantitativa dei dati dell'estrazione nel grafico 2.4.15 è possibile confrontare le medie e deviazione standard dei valori di assorbanza dei due protocolli per ogni campione.

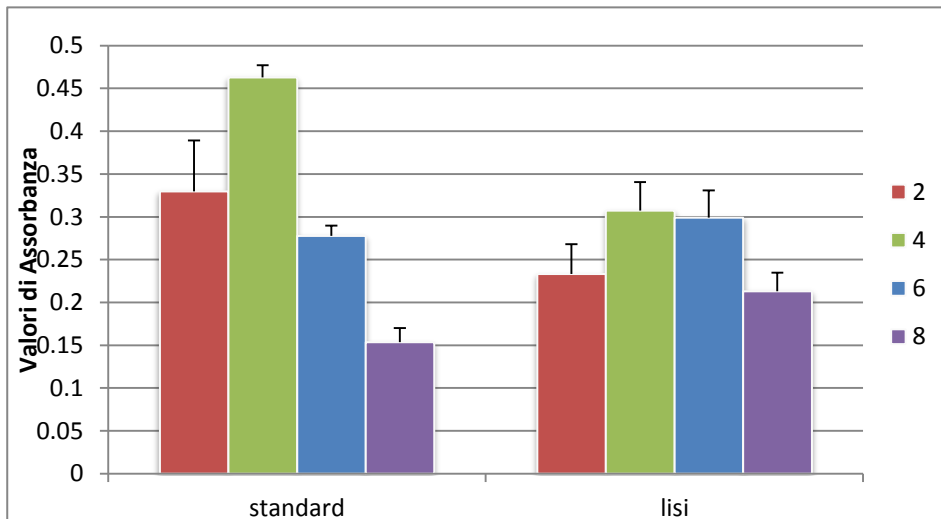


Figura 2.4.12 Grafici con media e deviazione standard dei valori di assorbanza dei pozzetti sottoposti a differenziamento adipogenico dei campioni 2, 4, 6 e 8 trattati con protocolli standard e lisi.

L'analisi statistica conferma le osservazioni qualitative, infatti non emerge dal T-test differenza statisticamente significativa dei dati di assorbanza tra i campioni trattati con protocollo Standard e Lisato. (P_value 0.4551)

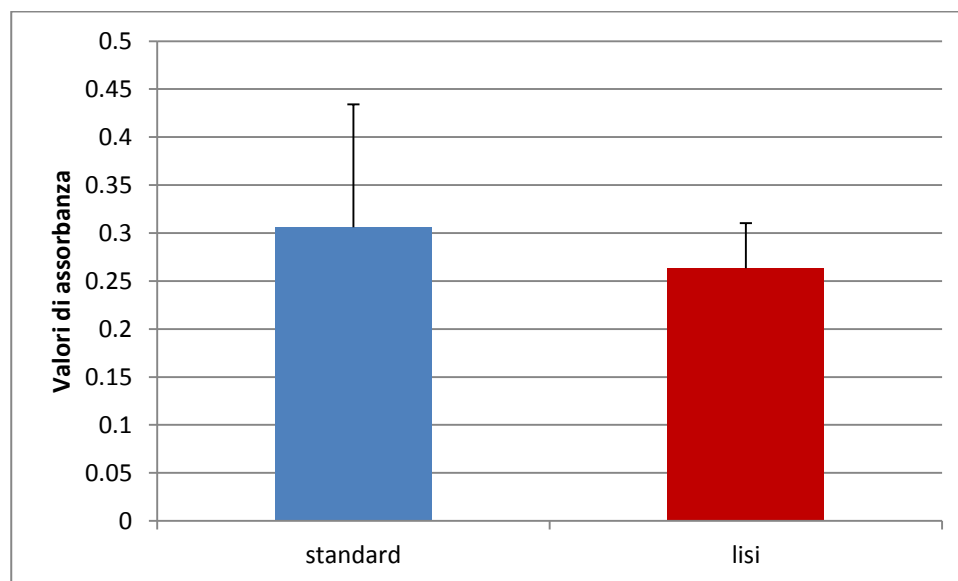


Figura 2.4.13 Istogrammi con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni trattati con protocollo Standard (STD) e Lisi (LISI).

Anche il test statistico Anova non da differenza significati nel confronto dei valori di assorbanza tra i tre protocolli (P_value di 0.4824).

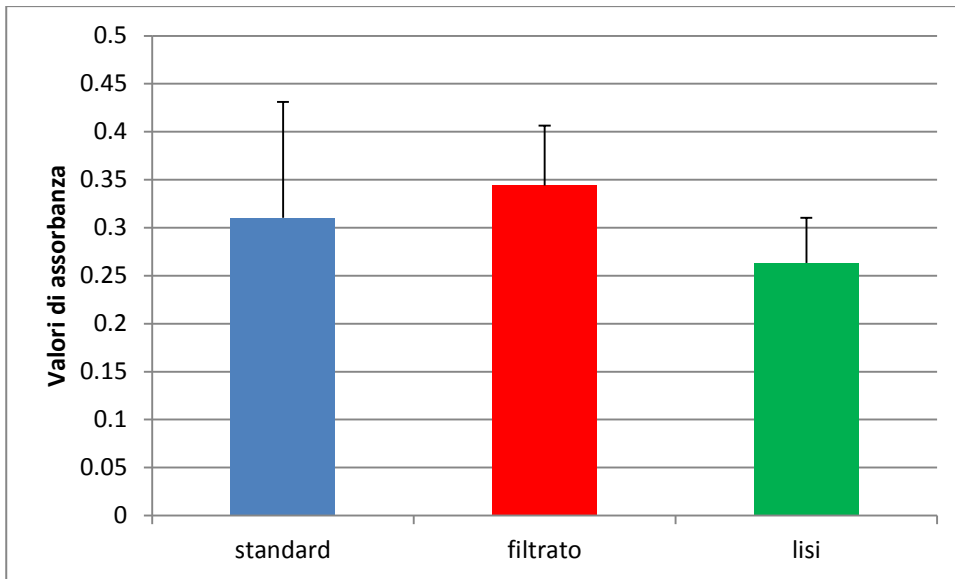


Figura 2.4 14 Istogrammi con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni trattati con protocollo Standard (STD), Filtrato (FIL) e di Lisi (LISI).

Infine vengono confrontati i valori di assorbanza dei pozzetti trattati con mezzo di differenziamento adipogenico e quelli dei pozzetti trattati con mezzo base per i tre protocolli (figura 2.4.18, 2.4.19 e 2.4.20). Il T-test accoppiato a due code mostra che c'è una differenza statisticamente significativa tra il trattamento con mezzo adipogenico e mezzo base sia per il protocollo Standard, sia per il protocollo Filtrato (P_value <0.0001) che per il protocollo di Lisi (P_value < 0.05). Si può dire, quindi, che il differenziamento è avvenuto solo nei pozzetti trattati con mezzo adipogenico.

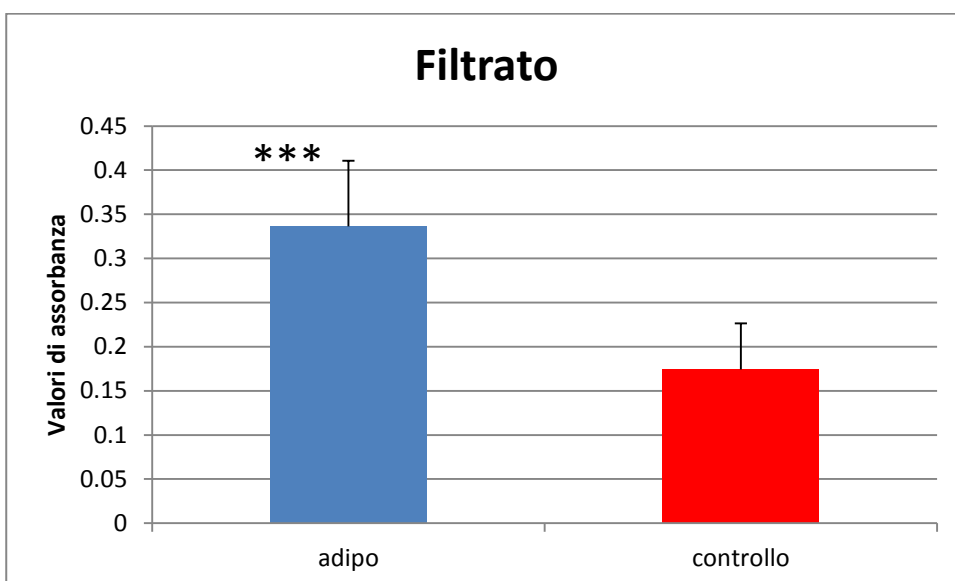


Figura 2.4.15 Istogramma con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni sottoposti a trattamento filtrato e mantenuti in coltura con mezzo per il differenziamento adipogenico (adipo) o mezzo base per le MSCs (controllo). I tre asterischi indicano un p_value inferiore a 0.0001.

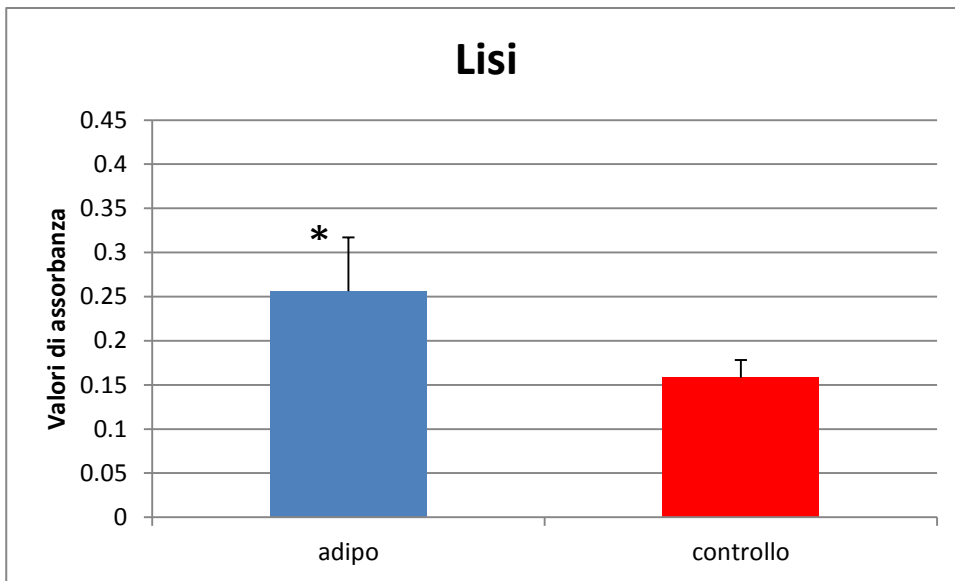


Figura 2.4.16 Istogramma con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni sottoposti a trattamento di lisi e mantenuti in coltura con mezzo per il differenziamento adipogenico (adipo) o mezzo base per le MSCs (controllo).

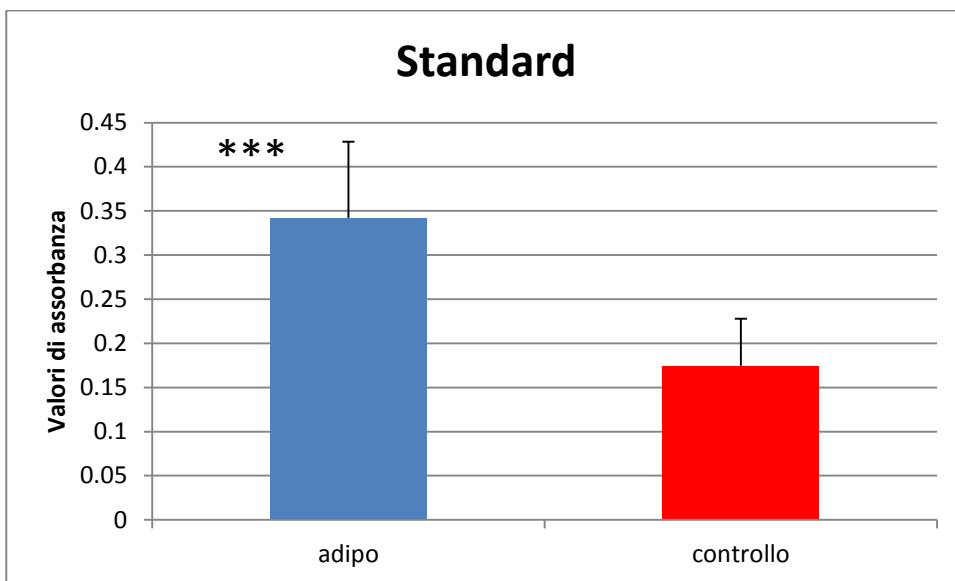



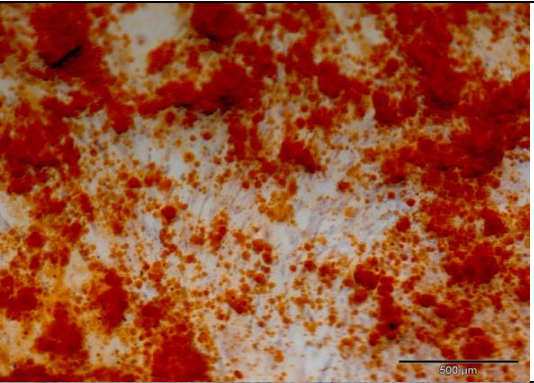
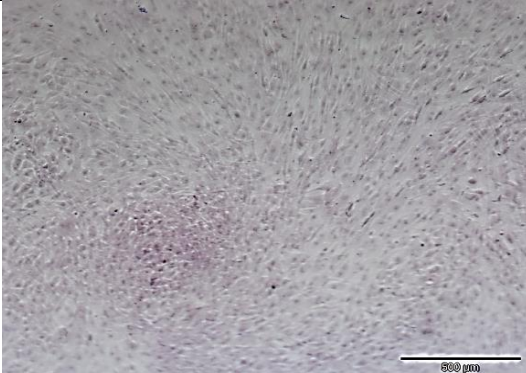
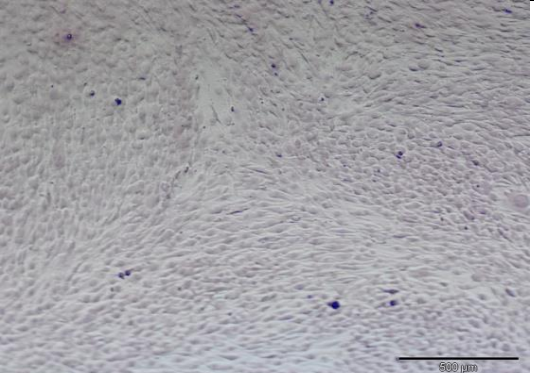
Figura 2.4.17 Istogramma con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni sottoposti a trattamento Standard e mantenuti in coltura con mezzo per il differenziamento adipogenico (adipo) o mezzo base per le MSCs (controllo). I tre asterischi indicano un p_value inferiore a 0.0001.

Differenziamento Osteogenico

In Tabella 2.4.6 vengono mostrate le immagini acquisite con microscopio dei pozzetti dopo la colorazione con Alzarin Red-S per i codici di due pazienti. Di ogni paziente si riporta per ogni riga il confronto tra un'immagine di un pozzetto trattato con protocollo standard e un'immagine di un pozzetto trattato con protocollo Filtrato. Leggendo la tabella in senso verticale si ha un confronto tra

i pozzetti trattati con mezzo di differenziamento osteogenico e quelli trattati con mezzo base relativi allo stesso codice trattato con lo stesso protocollo.

Paziente 1

Standard	Filtrato	
		Osteo
		Controllo

Paziente 2

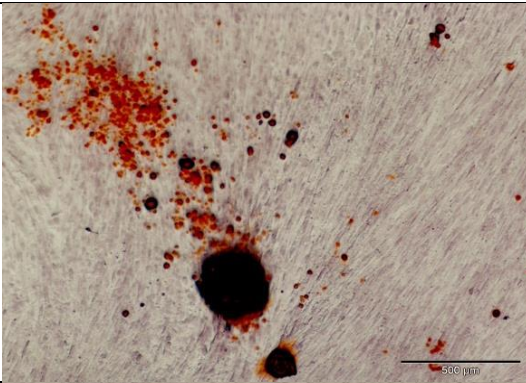
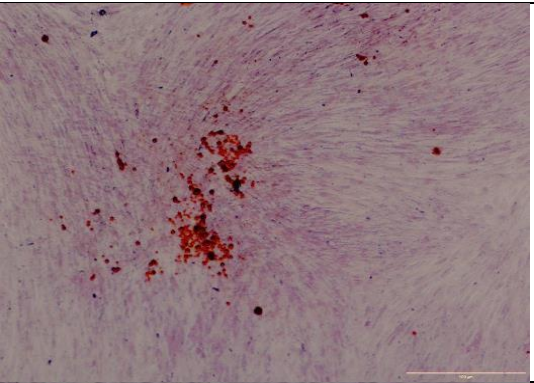
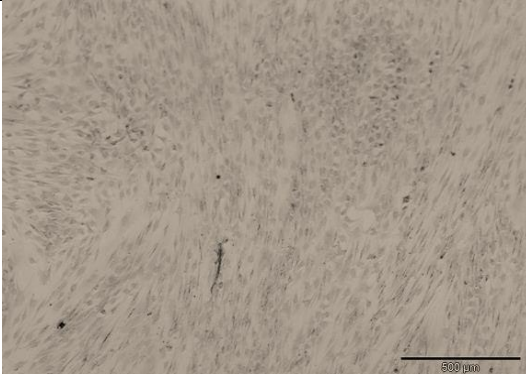
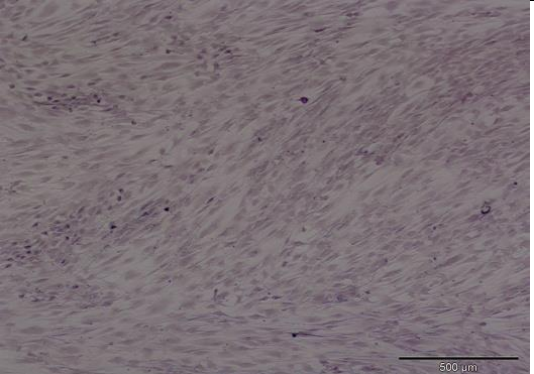
Standard	Filtrato	
		Osteo
		Controllo

Tabella 2.4.6 Immagini al microscopio dei pozzetti dopo colorazione Alzarin di due pazienti (rispettivamente codici 03 e 05). In alto: pozzetti mantenuti in coltura con mezzo di differenziamento osteogenico del campione trattato con protocollo Standard (a

sinistra) e Filtrato (a destra). In basso: pozzetti mantenuti in coltura con mezzo base delle MSCs del campione trattato con protocollo Standard (a sinistra) e Filtrato (a destra).

Lo scopo delle immagini è quello di dare un'idea qualitativa del differenziamento osteogenico. Nei pozzetti trattamenti con mezzo osteogenico è possibile riscontrare la presenza in entrambi i pazienti di depositi di matrice ossea evidenziati dalla colorazione Alzarin Red-S; questi non sono invece presenti nei pozzetti di controllo. Dall'analisi qualitativa delle immagini non emerge una differenza evidente nel differenziamento osteogenico tra i due protocolli.

Passando all'analisi quantitativa dei dati dell'estrazione nel grafico 2.4.21 è possibile confrontare le medie e deviazione standard dei valori di assorbanza dei due protocolli (Standard/Filtrato) per ogni campione.

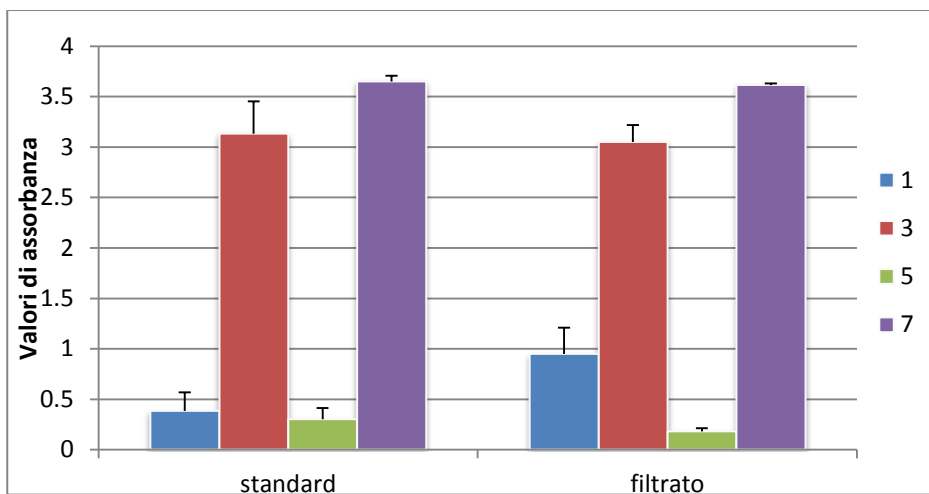


Figura 2.4.18 Grafici con media e deviazione standard dei valori di assorbanza dei pozzetti sottoposti a differenziamento osteogenico dei campioni 1, 3, 5 e 7 trattati con protocolli standard e filtrato.

L'analisi statistica conferma le osservazioni qualitative, infatti non emerge dal t test differenza statisticamente significativa dei valori di assorbanza tra i campioni trattati con protocollo Standard e Filtrato. (P_value 0.3166)

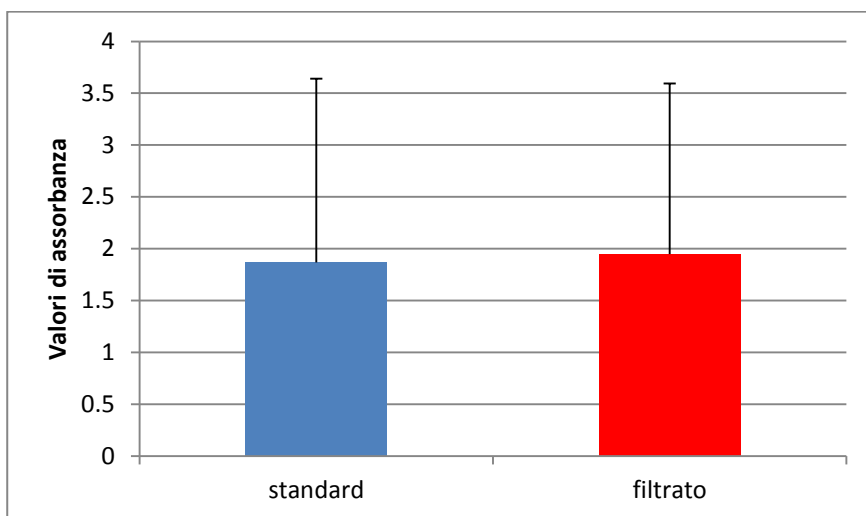
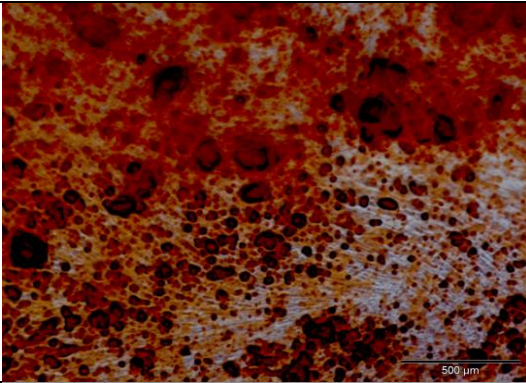
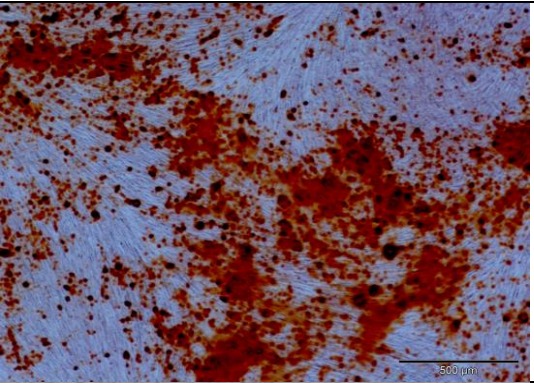
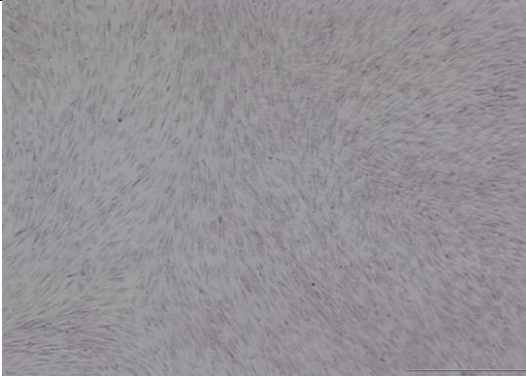
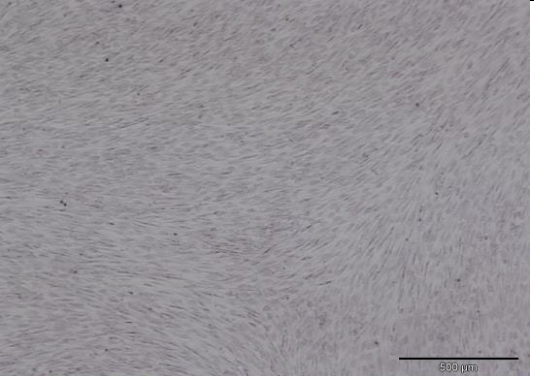


Figura 2.4.19 Istogrammi con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni trattati con protocollo Standard (STD) e Filtrato (FIL).

In tabella 2.4.7 vengono mostrate le immagini per il confronto tra il protocollo Standard e Lisi (lettura orizzontale) e tra il trattamento osteogenico e base di due pazienti (lettura verticale).

Paziente 1

Standard	Lisi	
		Osteo
		Controllo

Paziente 2

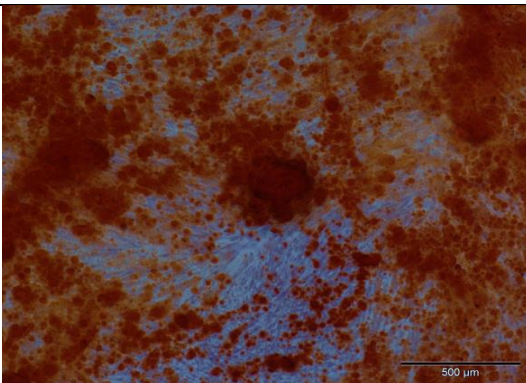
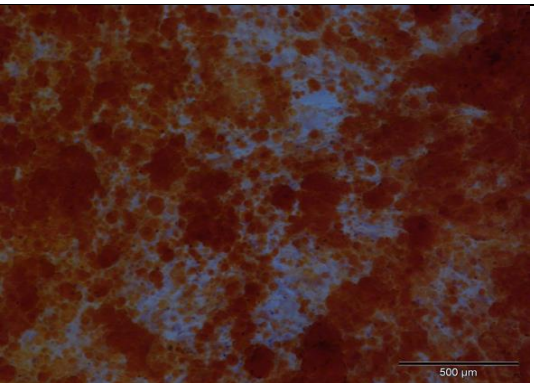
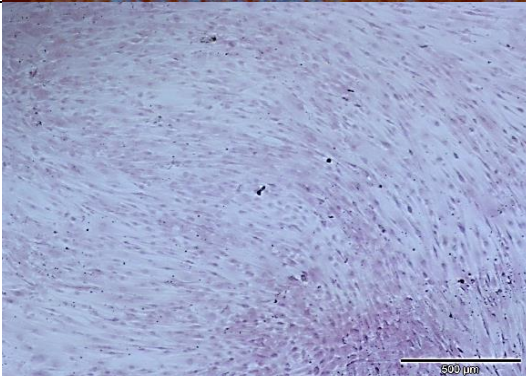
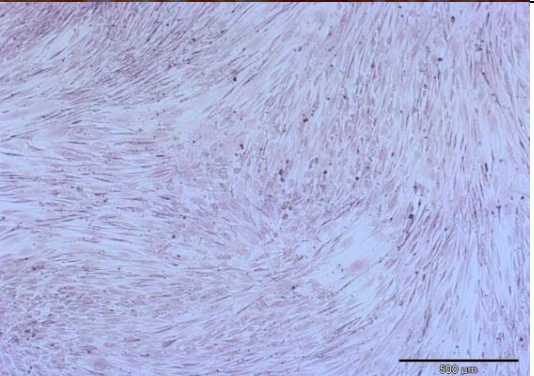
Standard	Lisi	
		Osteo
		Controllo

Tabella 2.4.7 Immagini al microscopio dei pozzetti dopo colorazione Alzarin di due pazienti (rispettivamente codici 06 e 08). In alto: pozzetti mantenuti in coltura con mezzo di differenziamento osteogenico del campione trattato con protocollo Standard (a

sinistra) e di Lisi (a destra). In basso: pozzetti mantenuti in coltura con mezzo base delle MSCs del campione trattato con protocollo Standard (a sinistra) e di Lisi (a destra).

Anche in questo caso l'analisi qualitativa delle immagini non mostra differenza tra i due protocolli, mentre si può notare come i depositi di matrice ossea siano presenti solo nei pozzetti trattati con mezzo di differenziamento osteogenico.

Passando all'analisi quantitativa dei dati dell'estrazione nel grafico 2.4.23 è possibile confrontare le medie e deviazione standard dei valori di assorbanza dei due protocolli per ogni campione.

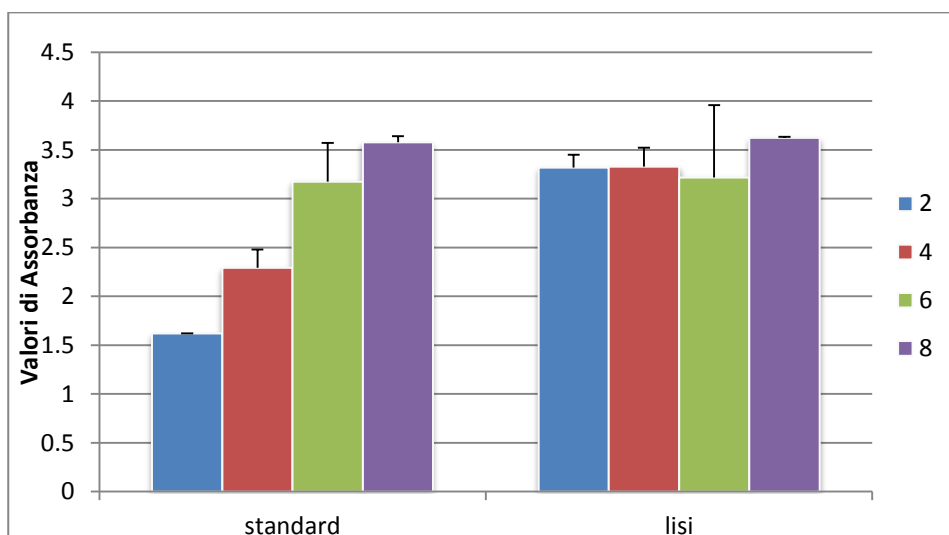


Figura 2.4.20 Grafici con media e deviazione standard dei valori di assorbanza dei pozzetti sottoposti a differenziamento osteogenico dei campioni 2, 4, 6 e 8 trattati con protocolli standard e di lisi

Il T-test accoppiato non esprime differenza statisticamente significativa nel differenziamento osteogenico tra i protocolli Standard e Lisato. ($P_{value}=0.1797$) Tuttavia è possibile notare un trend: il protocollo di Lisi presenta valori di assorbanza maggiori e con minore deviazione standard rispetto al protocollo Standard.

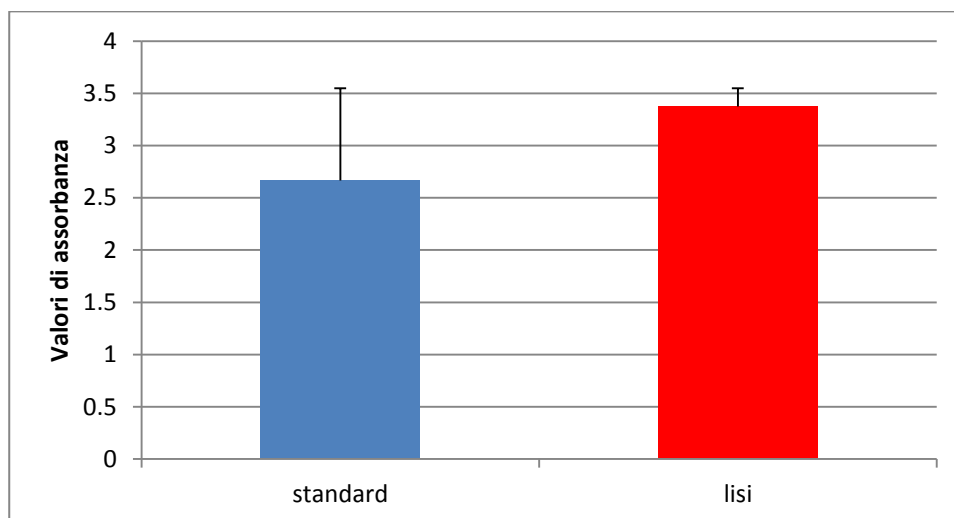


Figura 2.4.21 Istogrammi con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni trattati con protocollo Standard (STD) e di Lisi (LISI).

Anche il test statistico Anova non dà differenza significati nel confronto dei valori di assorbanza tra i tre protocolli (P_value di 0.4824) sebbene anche in questo caso si nota stesso trend osservato sopra.

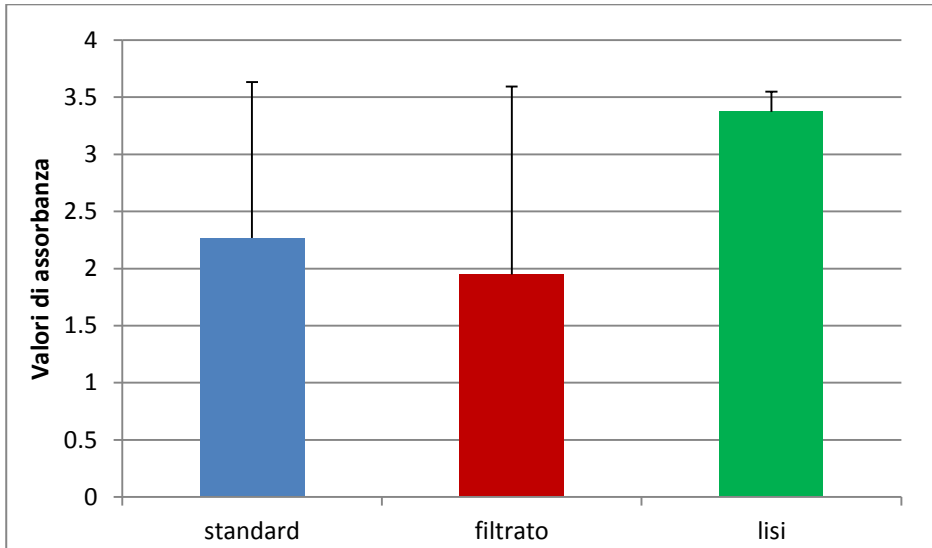


Figura 2.4.22 Istogrammi con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni trattati con protocollo Standard (STD), Filtrato (FIL) e di Lisi (LISI).

Infine vengono confrontati i valori di assorbanza dei pozzetti trattati con mezzo di differenziamento osteogenico e quelli dei pozzetti trattati con mezzo base per i tre protocolli (figura 2.4.26, 2.4.27 e 2.4.28). Il t-test accoppiato a due code mostra che c'è una differenza statisticamente significativa tra il trattamento con mezzo osteogenico e mezzo base sia per i protocolli Standard e di Lisi (P_value <0.0001) che per il protocollo Filtrato (P_value < 0.01). Si può dire, quindi, che il differenziamento è avvenuto solo nei pozzetti trattati con mezzo osteogenico.

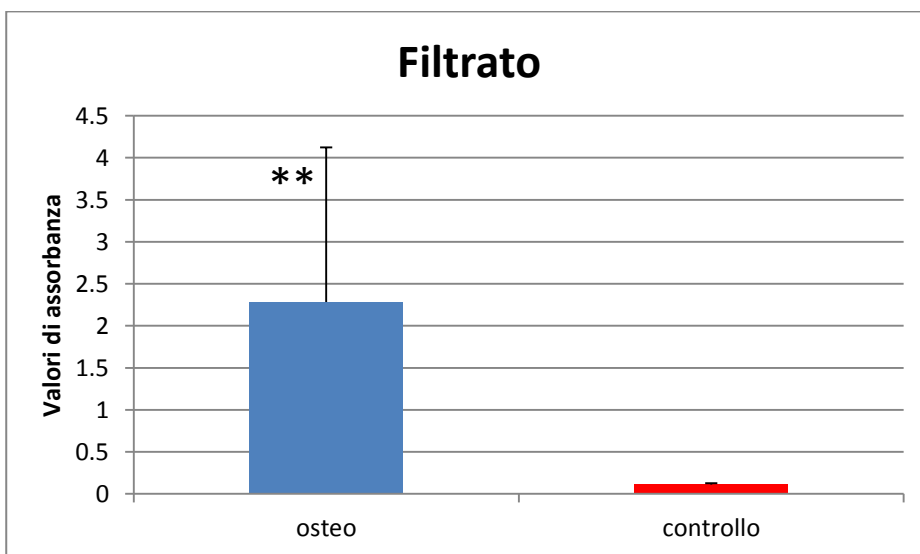


Figura 2.4.23 Istogramma con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni sottoposti a trattamento Filtrato e mantenuti in coltura con mezzo per il differenziamento osteogenico (oste) o mezzo base per le MSCs (controllo).

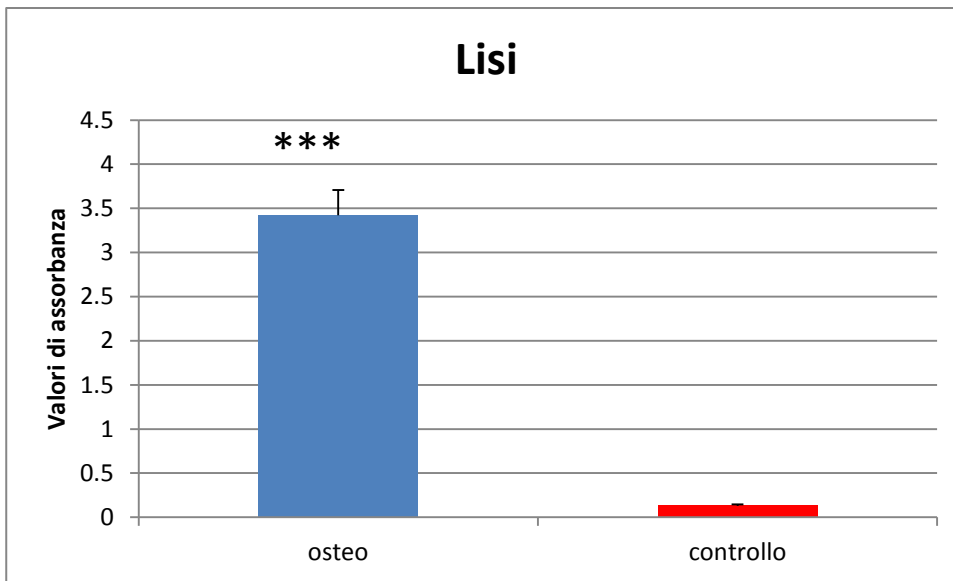


Figura 2.4.24 Istogramma con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni sottoposti a trattamento di Lisi e mantenuti in coltura con mezzo per il differenziamento osteogenico (oste) o mezzo base per le MSCs (controllo). I tre asterischi indicano un p_value inferiore a 0.0001.

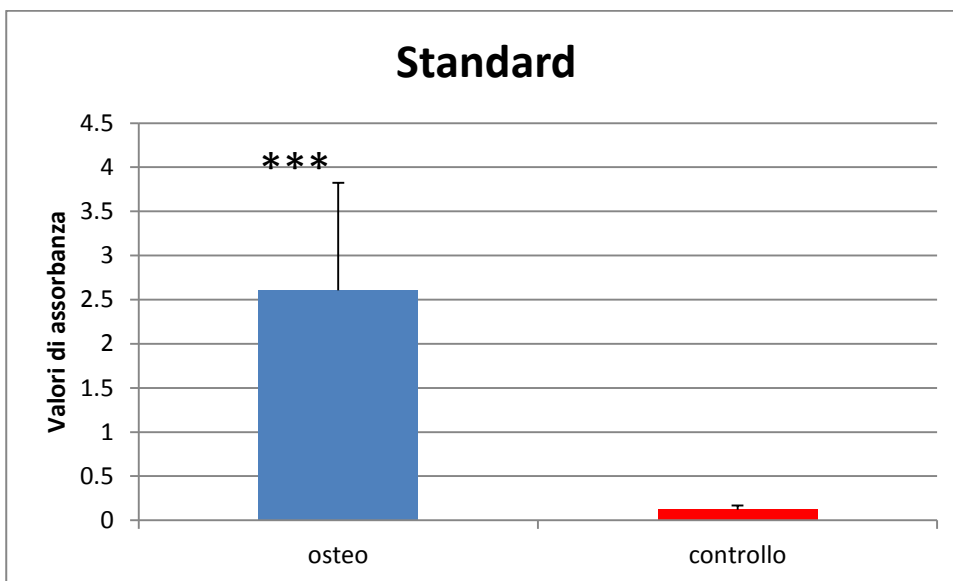


Figura 2.4.25 Istogramma con media e deviazione dei valori di assorbanza dei campioni sottoposti a trattamento Standard e mantenuti in coltura con mezzo per il differenziamento osteogenico (oste) o mezzo base per le MSCs (controllo). I tre asterischi indicano un p_value inferiore a 0.0001.

2.5 Conclusioni e sviluppi futuri

L'analisi statistica effettuata sui risultati degli esperimenti di resa, colonialità e differenziamento adipogenico e osteogenico nel confronto tra i tre protocolli di isolamento delle cellule staminali mesenchimali provenienti dal midollo osseo di scarto degli interventi di protesizzazione dell'anca mostra come non ci sia significatività nella differenza dei risultati ottenuti con i tre protocolli. I dati

estratti dagli esperimenti risultano essere molto variabili in quanto sono paziente-specifici; tuttavia sottoporre uno stesso paziente (codice) a due tipi di protocolli per confrontarli elimina questa problematica e permette di effettuare un t-test accoppiato che mostra quanto una determinata proprietà dipenda dal protocollo seguito dal campione.

L'unica differenza statisticamente significativa rilevata è stata nel confronto tra i pozzetti fatti differenziare e quelli mantenuti in coltura con il mezzo base delle MSCs, a dimostrazione del fatto che le cellule di campioni analizzati, se messi in coltura con mezzi opportuni riescono a differenziare verso la linea osteogenica e adipogenica.

Si può quindi concludere, a partire dai risultati, che sottoporre il campione di midollo alle tre metodiche non cambia in modo significativo le sue proprietà di resa, colonialità e differenziamento (osteogenico e adipogenico). Pertanto è possibile nella fase di progettazione del dispositivo microfluidico in esame scegliere il protocollo che permetta un più efficace inserimento del campione nel dispositivo. Questi risultati permettono quindi al progettista di possedere un più ampio grado di libertà nella scelta delle specifiche di progetto.

Capitolo 3

*Simulazioni computazionali per
la progettazione del
microdispositivo*

3.1 Introduzione

La microfluidica è la scienza e l'insieme di tecnologie in grado di trattare piccole quantità di fluido ($10^{-6}/10^{-10}$ litri) usando canali di dimensioni che vanno dalle decine alle centinaia di micrometri. I vantaggi di questa tecnologia sono quelli poter di trattare piccole quantità di campione e di reagente e di poter selezionare particelle di dimensioni molto piccole con grande risoluzione e sensibilità, basso costo, tempi di analisi limitati. [Whitesides et al.,2006]

Per la progettazione e l'ottimizzazione di dispositivi microfluidici vengono comunemente usati metodi di analisi computazionale fluidodinamica. Tramite questi è possibile calcolare in modo teorico i campi di velocità e le linee di flusso all'interno del dispositivo prima della sua fabbricazione in modo da ottimizzarne il design, il flusso e le specifiche di progetto evitando numerose e costose indagini sperimentali. [Erickson et al.,2005]

La microfluidica trova molti campi di applicazione tra cui la selezione cellulare (cell sorting), ovvero la selezione di un determinata componente cellulare all'interno di un campione biologico. Esistono varie tecniche di cell sorting che possono essere classificate in tecniche basate su parametri fisici del campione o su affinità. Oltre a queste tecniche tradizionali esistono metodi in via di sviluppo tra i quali l'adesione selettiva tramite l'utilizzo di aptameri specifici. [Zhu et al.,2013]

3.2 Obiettivi

Il contenuto di questo elaborato si inserisce all'interno delle attività di un progetto che integra tecniche di adesione selettiva tramite aptamero specifico in un dispositivo microfluidico, allo scopo di isolare una specifica componente cellulare, le cellule staminali mesenchimali.

Questo capitolo raccoglie le attività preliminari di progettazione di un dispositivo microfluidico nel quale inserire e trattare il campione biologico di midollo osseo pretrattato al fine di isolare la componente di cellule staminali mesenchimali. Lo scopo di questa sezione è quello di studiare e analizzare la fluidodinamica in modo da ottimizzare la geometria del dispositivo creando le condizioni più favorevoli per l'interazione della componente cellulare di interesse con l'aptamero ed evitando la formazione di zone di ristagno del campione.

3.3 Materiali e Metodi

3.3.1 Design del dispositivo: progettazione e ottimizzazione

Si sono individuati i seguenti vincoli e specifiche di progetto:

- Il dispositivo deve avere una geometria facilmente realizzabile con le tecnologie di microfabbricazione standard (soft-lithography).
- Un'area consistente della superficie interna del dispositivo dovrà essere trattata e coperta con un coating che espone un aptamero specifico.
- Le cellule, in particolare quelle da isolare, dovranno essere indotte a entrare in contatto con la parte di dispositivo che espone l'aptamero. E' necessario che la dimensione della zona da trattare sia ottimizzata al fine di ridurre i costi (l'aptamero e le tecniche di superficie per legare l'aptamero al dispositivo hanno costi elevati) mantenendo la stessa efficienza.
- Il flusso sulla zona trattata con l'aptamero deve essere omogeneo, ovvero i valori di velocità nella zona non dovranno variare più del 5%. Questa specifica permette di avere un comportamento delle particelle simile in tutta la zona trattata.
- La portata di fluido deve essere tale che il dispositivo comporti tempi ragionevoli di trattamento del campione.
- La zona trattata con l'aptamero deve raccordarsi in modo efficiente con l'inlet e l'outlet, che prevedono l'utilizzo di tubi collegati a pompe siringhe.
- Le zone di ristagno a basso shear rate devono essere ben monitorate ed evitate perché comportano la sedimentazione della componente cellulare.
- I valori di shear stress non devono essere dannosi per le cellule (lo shear stress *in vivo* è intorno a 0.8-3.8 Pa [Koch et al.,2010]).

Per la progettazione e l'ottimizzazione del dispositivo si sono condotte simulazioni con i programmi di analisi computazionale Fluent e Comsol. La fluidodinamica del dispositivo (fase continua) al variare di alcune caratteristiche geometriche è stata studiata con Fluent, mentre Comsol è stato usato in un secondo momento per l'analisi delle traiettorie cellulari all'interno del dispositivo usando il modulo del Particle Tracing, messo a punto (vedi Appendice 7) precedentemente dopo aver verificato che i due codici dessero dei risultati comparabili della fluidodinamica. Non è stato possibile svolgere tutta l'analisi con il codice Comsol a causa dell'elevato costo computazionale richiesto dalle simulazioni, non supportabile dall'hardware a disposizione presso i laboratori. In Fluent si è simulata metà della geometria sfruttando la simmetria del dispositivo per ridurre il costo computazionale, mentre in Comsol è stato necessario ridurre ulteriormente la parte di geometria simulata per poter usare una discretizzazione appropriata.

Geometria di base

Il primo step preso in considerazione durante la realizzazione del prototipo del dispositivo in esame è stato la creazione di una geometria che garantisse l'omogeneità del flusso nella zona target (zona ricoperta con l'aptamero) e un raccordo ottimale di tale zona con ingresso e uscita. A tal fine sono stati considerati diversi tipi di geometrie, in seguito scartati perchè non facilmente raccordabili con l'ingresso e l'uscita del dispositivo o perchè non garantivano un flusso omogeneo. In figura 3.3.1 si riportano alcuni esempi di queste geometrie.

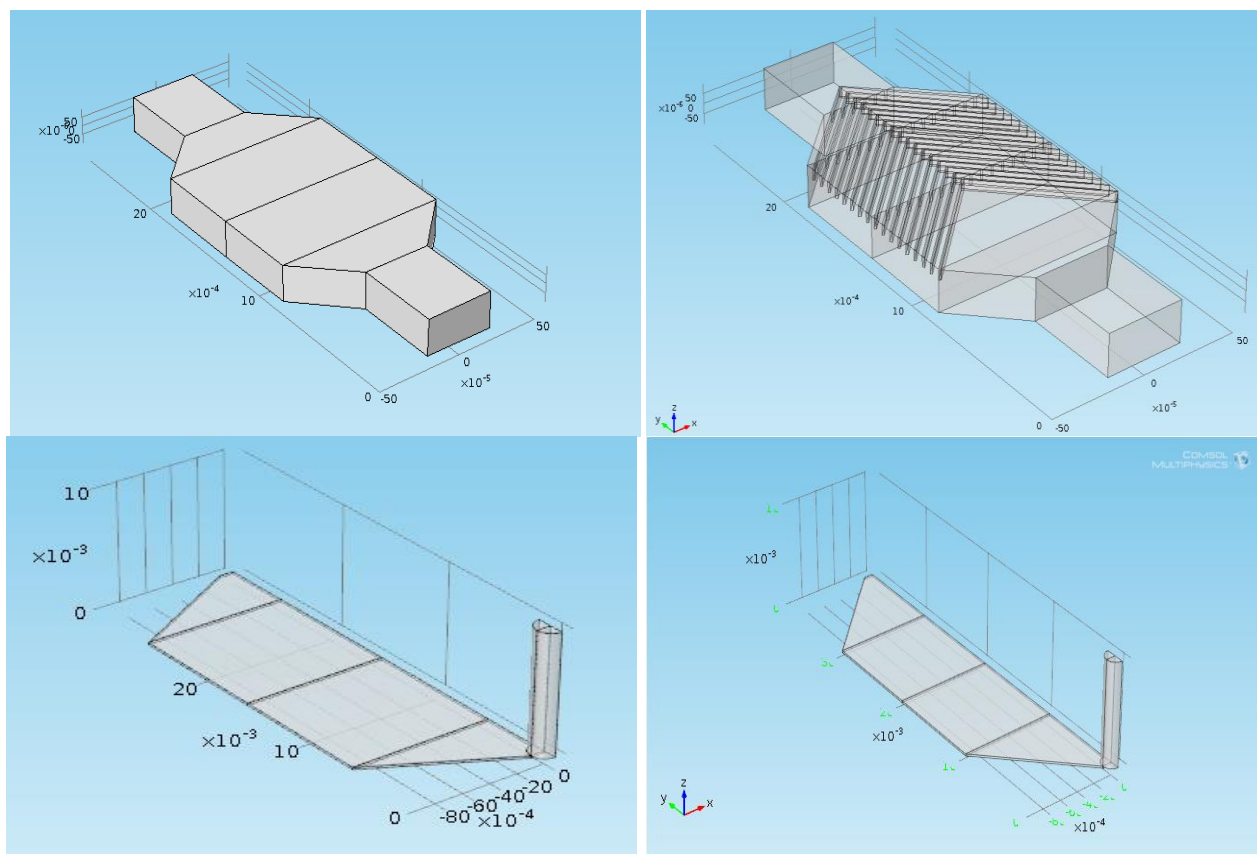


Figura 3.3.1 Immagini di quattro geometrie in seguito scartate.

Di seguito viene riportato il processo di progettazione riferito alla sola geometria ritenuta migliore e più semplice da realizzare. Nella scelta della geometria si è partiti ipotizzando che la zona trattata con l'aptamero avesse la forma di un rettangolo di dimensioni 3 cm x 2 cm e che inlet e outlet fossero due condotti (schematizzati come due cilindri) di diametro 2 mm. La lunghezza del tubo di inlet è scelta in modo tale da far sì che il flusso sia sviluppato prima di entrare nel dispositivo. Lo spessore del dispositivo sarà di due ordini di grandezza inferiore rispetto alle altre dimensioni poichè si vuole lavorare in un dispositivo che sia assimilabile ad una camera a piatti piani paralleli. Nella prima fase di progettazione si è ipotizzato uno spessore del dispositivo di 200 μm , successivamente, a seguito di un più approfondito esame del campione reale da trattare, lo spessore è stata aumentato a 500 μm . Si è scelta una portata di 10 mL/h, ritenuta adatta a poter processare un volume adeguato di campione (decine di millilitri) in tempi accettabili (ore). Successivamente tale

portata è stata dimezzata per verificare l'influenza di tale parametro all'omogeneità del flusso. I raccordi tra la zona ricoperta di aptamero e inlet e outlet devono essere gradualissimi in modo da evitare zone di ricircolo e di ristagno, ma allo stesso tempo le zone di raccordo non devono essere troppo sviluppate in lunghezza per evitare che una componente troppo elevata della componente cellulare sedimenti per gravità (con possibilità di aderire in modo aspecifico) prima di raggiungere la zona di adesione selettiva. A fronte di tali considerazioni sono state analizzate due possibili raccordi di angolazione tra inlet e zona target (15°-30°) (Figura 3.3.2). Infine la geometria scelta è stata quella che garantiva maggiore omogeneità nella zona target e minori zone di ristagno.

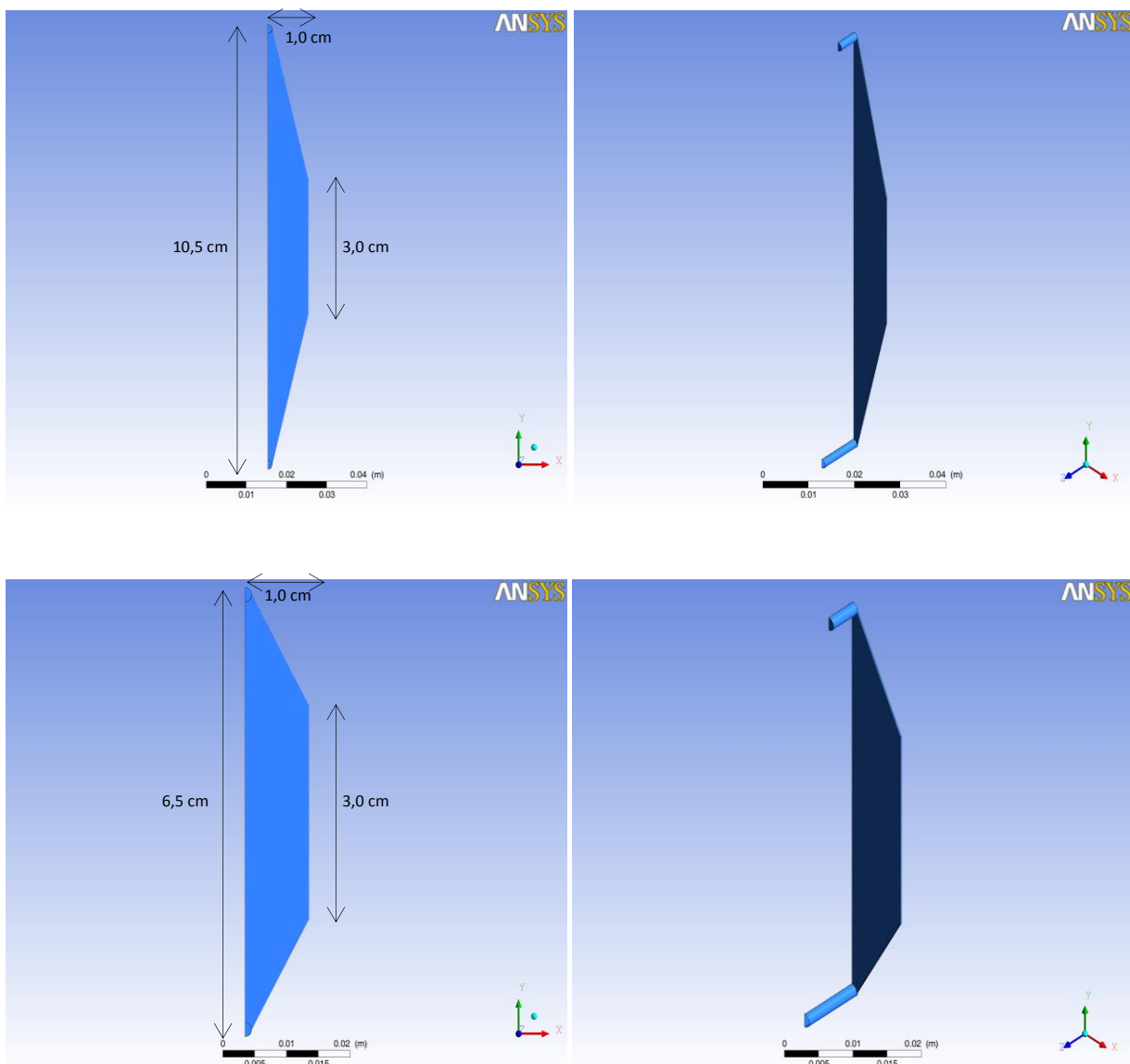


Figura 3.3.2 In alto: immagini della geometria del dispositivo con angolo di raccordo di 15°. In basso: immagini della geometria del dispositivo con angolo di raccordo di 30°.

Per questa parte di progettazione della geometria base è stato utilizzato il programma Fluent. Le equazioni della fluidodinamica vengono risolte con il metodo a volumi finiti pressure-velocity

coupling SIMPLE utilizzando Upwind del secondo ordine. Si impostano i coefficienti di pressione a 0.7 e di momento a 0.3 indicati per fluidi come l'acqua. I residui vengono impostati a 10^{-4} verificando che il valore di velocità sul piano medio x-z si sia stabilizzato in funzione delle iterazioni.

Essendo il dispositivo simmetrico si sfrutta tale simmetria per simulare solo metà della geometria.

Per le simulazioni si impostano i seguenti parametri:

- Regime stazionario laminare.
- Il profilo di velocità in ingresso è parabolico e viene impostato il valore di velocità massima in modo da garantire la portata di riferimento ($2.78 \cdot 10^{-9} \text{m}^3/\text{s}$). In appendice è presente lo script inserito per definire il profilo di velocità.
- La pressione è nulla all'outlet.
- Le pareti presentano la condizione di non scivolamento.
- I parametri del fluido impostati sono: viscosità di $0.00076 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ e densità di 1000 kg/m^3 .

Dopo aver condotto le simulazioni, si effettua un'analisi di post-processing andando a confrontare il profilo di velocità sulla linea media, l'ampiezza della zona con flusso omogeneo (variazioni di velocità inferiori al 5% rispetto al valore massimo sulla linea media) con una mappa colore che rappresenti la velocità. Si ritiene che questi parametri siano i più significativi per una scelta ottimale della geometria.

Focusing orizzontale

Il focusing orizzontale è una tecnica che permette di evitare che cellule sedimentino in corrispondenza delle zone a velocità di fluido più bassa e di possibile ristagno. Dai risultati delle simulazioni della geometria base è emerso che le zone critiche del dispositivo per possibile ristagno sono quelle vicino alle pareti laterali e in prossimità di variazioni angolari. Prendendo spunto dalla letteratura [Lee et al.,2006] si è andati quindi a confrontare diverse tipologie di geometria di focusing orizzontale con l'obiettivo di concentrare il passaggio delle cellule nella zona ricoperta dall'aptamero con flusso omogeneo. Il focusing orizzontale si effettua aggiungendo nel dispositivo un canale laterale al cui interno scorre fluido privo di cellule. Esistono studi analitici che permettono di determinare quale sia la larghezza della parte di geometria che verrà attraversata dalla componente cellulare in base al rapporto tra la portata di inlet e quella di focusing orizzontale. [Lee et al.,2006] Tuttavia questi studi sono effettuati su una geometria di canale semplice a sezione rettangolare costante.

Viene quindi confrontata la fluidodinamica per quattro diversi canali laterali di focusing (Figure 3.3.3, 3.3.4, 3.3.5 e 3.3.6).

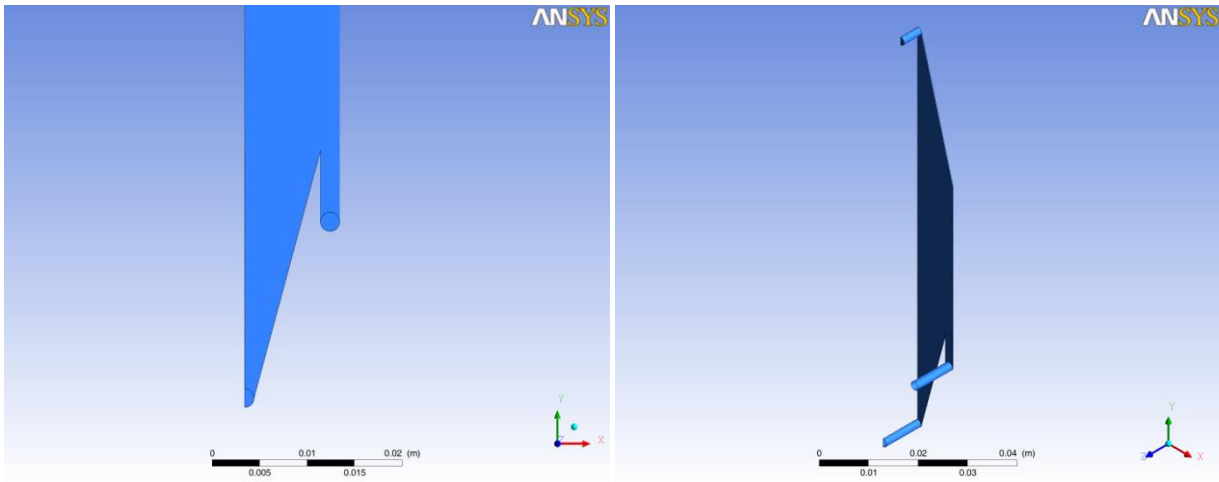


Figura 3.3.3 Immagini del dispositivo con canale di focusing laterale alla fine del divergente e inserito parallelamente al flusso.

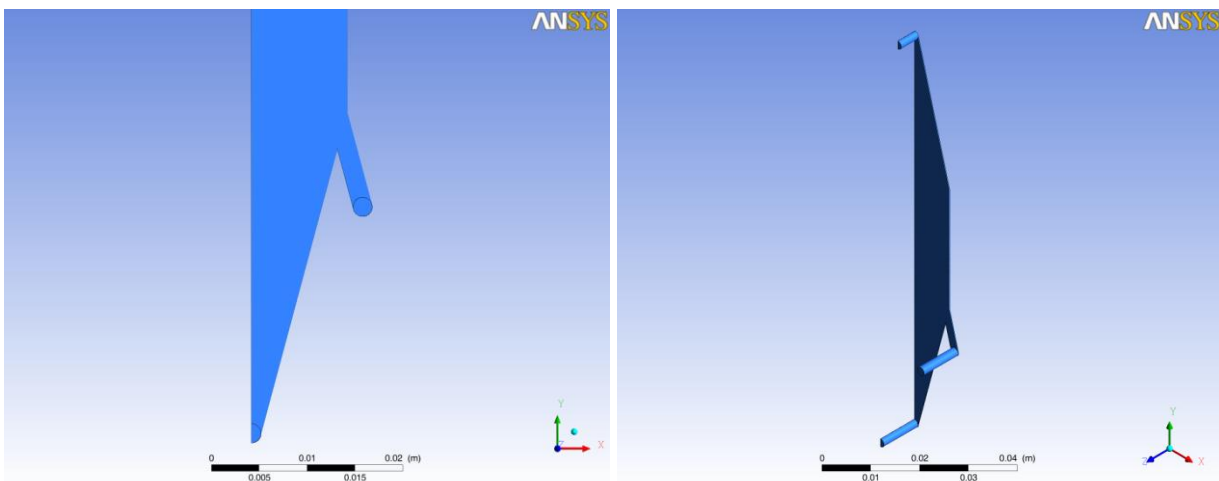


Figura 3.3.4 Immagini del dispositivo con canale di focusing laterale inclinato di 15° rispetto alla direzione del flusso.

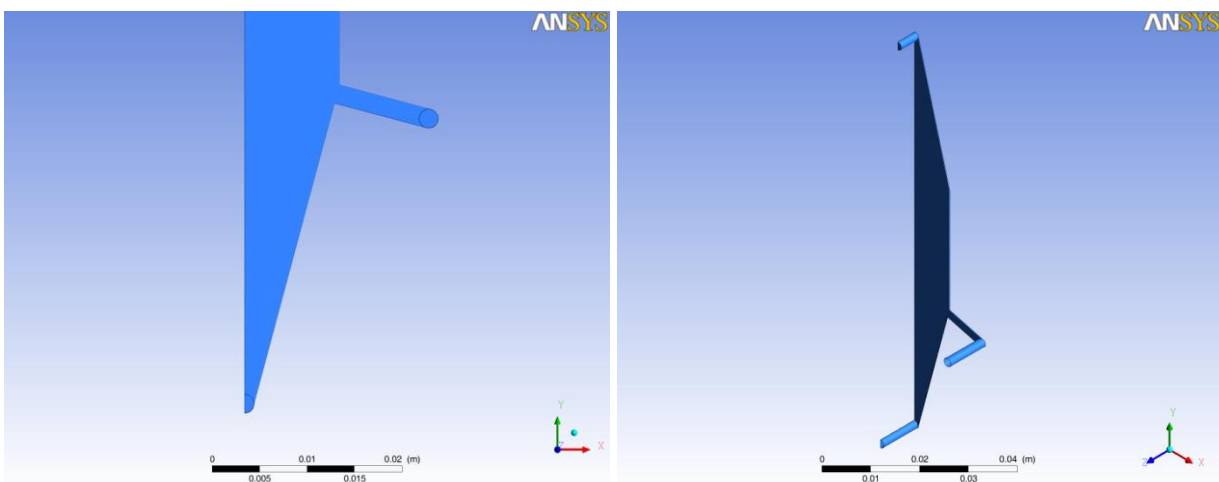


Figura 3.3.5 Immagini del dispositivo con canale di focusing laterale che forma un angolo di 90° con la parte di raccordo del dispositivo.

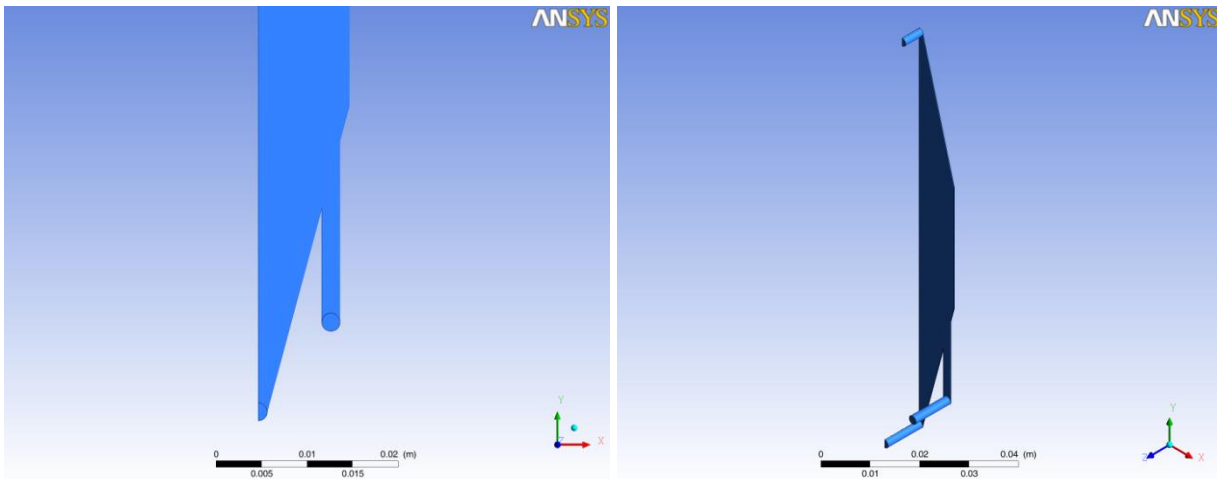


Figura 3.3.6 Immagini del dispositivo con canale di focusing laterale parallelo al flusso e posto a monte rispetto all'inizio della zona trattata con l'aptamero.

I parametri di simulazione inseriti nel programma sono gli stessi descritti precedentemente per la scelta della geometria di base ai quali viene aggiunto il profilo di ingresso di velocità del canale laterale. Per ogni simulazione sono stati valutati l'ampiezza della zona con flusso omogeneo (variazioni di velocità inferiori al 5% rispetto al valore massimo sulla linea media) tramite mappe di colore di velocità e le linee di flusso.

Dopo aver scelto la modalità di focusing laterale migliore, si è passati alle simulazioni di particle tracing svolte con il modulo disponibile sul software Comsol, precedentemente messo a punto (Appendice 7), per verificare l'effetto del focusing sulla componente cellulare. Viene simulata solo la parte del dispositivo che va dall'inlet a 1/3 della zona di target per motivi di peso computazionale eccessivo della simulazione. Sebbene semplificata, la geometria simulata permette di comprendere se il focusing avviene con successo. Nel modulo del Particle Tracing di Comsol vengono impostati i seguenti parametri:

- Densità delle particelle: 1030 Kg/m^3
- Diametro delle particelle: $10 \mu\text{m}$
- Numero di particelle: 550

Le particelle sono inserite nel volume del tubo di inlet del dispositivo, il loro numero è tale da garantire una densità di particelle della soluzione di 10^5 cell/mL , densità cellulare tenuta come riferimento perché utilizzata in letteratura e considerata adeguata per dispositivi simili (una densità cellulare troppo elevata non garantirebbe un'efficiente selezione del campione). [Hatch et al.,2012] [Karnik et al.,2008] [Lahann et al.,2003] [Plouffe et al.,2009] [Vickers et al.,2012]

La simulazione prevede che nel dispositivo sia presente il contributo della forza di drag (forza di trascinamento dovuta al moto del fluido) e della forza di gravità (vedi Appendice 7). Quest'ultima

farà cadere le particelle lungo il tragitto percorso. Una volta cadute le particelle avanzano con la velocità che possiede il fluido in quel punto.

Focusing verticale

La tecnica del focusing verticale permette di inserire uno o più flussi di fluido che possono costringere le cellule del campione verso la base del dispositivo in modo da aumentare la possibilità di interazione tra cellule e l'aptamero. Come il focusing orizzontale anche quello verticale prevede l'inserimento di una portata di buffer/fluido senza cellule. Per essere efficace la portata di focusing verticale dovrà essere posizionata a valle dell'ingresso delle cellule in direzione del flusso di fluido. Variando il rapporto tra la portata di focusing verticale e quella di ingresso è possibile controllare quanto la sezione di passaggio del fluido cellulare sia ridotta e costretta verso la base dal fluido privo di cellule. Vengono prese in considerazione tre diverse geometrie di focusing (Figure 3.3.7, 3.3.8 e 3.3.9), tenendo in conto il vincolo costruttivo della distanza tra i due ingressi pari a 10 mm (inlet con cellule e inlet di focusing).

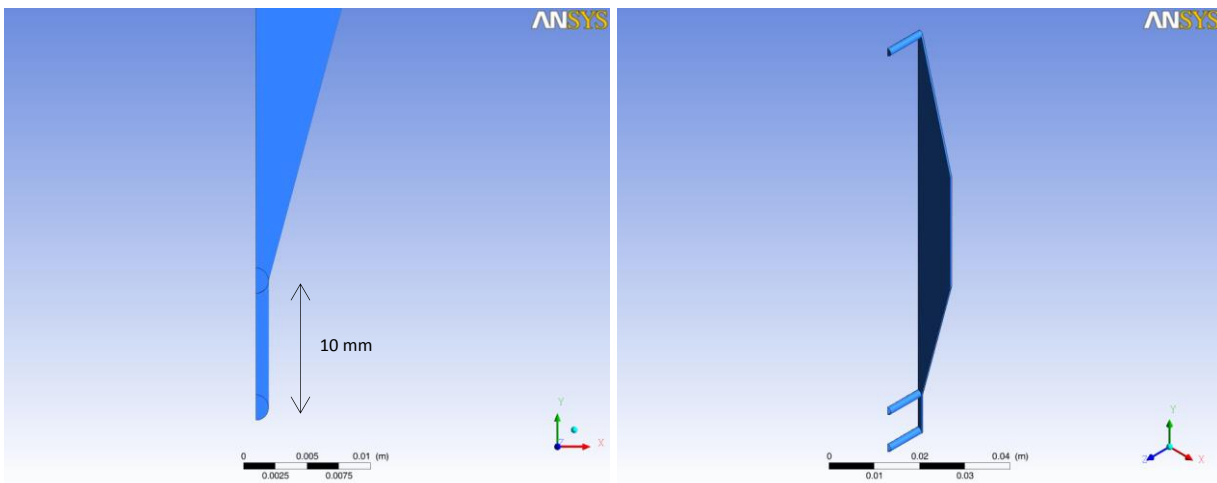


Figura 3.3.7 Immagini del dispositivo con canale di focusing verticale all'inizio del divergente. La distanza tra i due ingressi è di 10 mm.

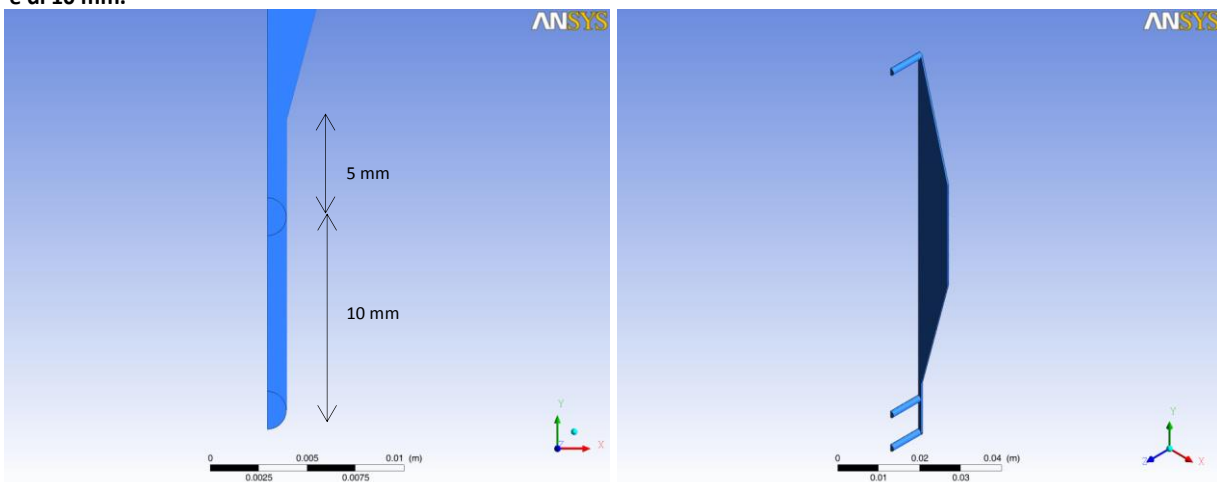


Figura 3.3.8 Immagini del dispositivo con canale di focusing verticale posto a monte di 5 mm rispetto all'inizio del

divergente. La distanza tra i due ingressi è di 10 mm.

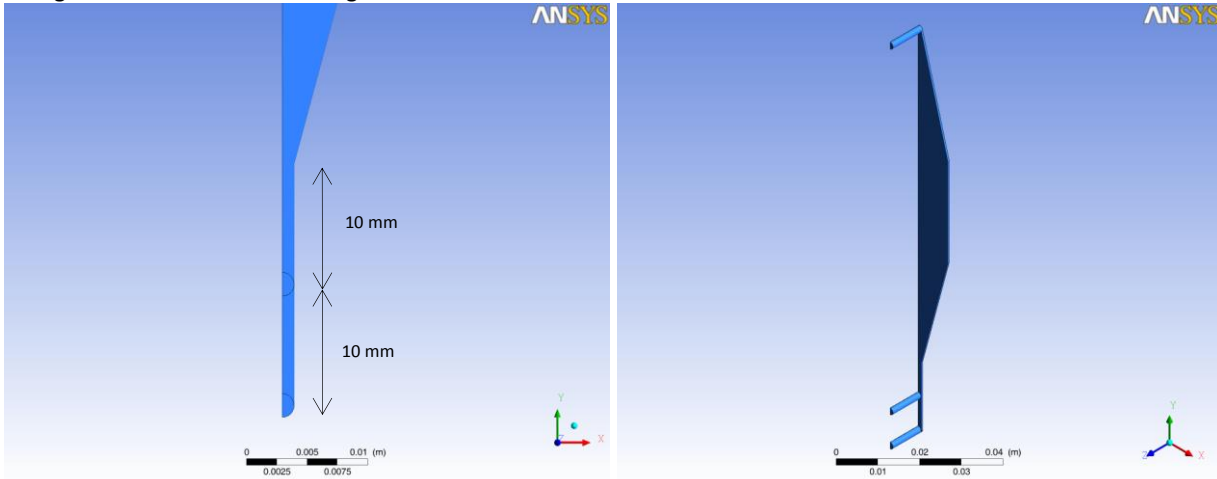


Figura 3.3.9 Immagini del dispositivo con canale di focusing verticale posto a monte di 10 mm rispetto all'inizio del divergente. La distanza tra i due ingressi è di 10 mm.

Le tre geometrie differiscono per la distanza tra il canale di focusing e l'inizio del divergente (focusing verticale all'inizio del divergente, collocato a monte di 5 mm e collocato a monte di 10 mm rispetto all'inizio del divergente).

Per ogni simulazione sono stati valutati l'ampiezza della zona con flusso omogeneo (variazioni di velocità inferiori al 5% rispetto al valore massimo sulla linea media) espressa in mappe colore di velocità e le linee di flusso.

Con Comsol viene analizzato l'effetto delle diverse varianti geometriche di focusing verticale sulla posizione delle particelle nella sezione verticale all'inizio della zona ricoperta con l'aptamero. In tal modo è possibile visualizzare come il fluido cellulare venga costretto verticalmente dalla portata di focusing.

Una volta scelta la tecnica migliore di focusing verticale si sono condotte simulazioni sia variando il rapporto tra le portate di inlet e di focusing che variando la velocità in ingresso del focusing verticale (mantenendo invariato il rapporto tra le portate di focusing e di ingresso) al fine di stabilire quale fosse la portata di focusing ottimale. Successivamente sono state condotte simulazioni variando densità delle particelle, per verificare l'effetto che tale parametro ha sulla sedimentazione, poiché la densità delle cellule staminali può variare intorno al valore 1030 kg/m^3 . Variando il diametro delle particelle, invece, si è andati a verificare come l'effetto del focusing verticale influisca sulle diverse tipologie cellulari. Infine, a partire dai dati sperimentali di caratterizzazione del campione, vengono condotte simulazioni con un fluido cellulare che ne rispecchi la composizione: diametri diversi sono stati impostati sulla base dei dati di frequenza degli istogrammi rilevati nel capitolo precedente. Poiché si osserva che gli istogrammi del protocollo Standard e Filtrato hanno distribuzioni simili vengono condotte due simulazioni, una rappresentante l'inserimento del campione lisato e una rappresentante il campione Standard/Filtrato. Si è deciso di

suddividere le 550 particelle inserite (che permettono di avere una densità di 10^5 cell/mL) in tre gruppi di particelle in base al diametro: particelle di diametro di 4 μm (che rappresentano le particelle di diametro 3 4 5 μm), particelle di diametro 7 μm (che rappresentano le particelle di diametro 6 7 8 μm) e particelle di diametro 10 μm (che rappresentano le particelle con diametro 9 10 11 μm). La percentuale di ogni componente è ricavata dalla somma delle percentuali delle componenti che rappresentano.

3.4 Risultati

Scelta geometria di base: angolo di raccordo di 15° - 30°

In figura 3.4.1(a)(c) viene riportato il profilo di velocità sulla linea media a metà dell'altezza del dispositivo. Il profilo risulta piatto lungo circa tutta la larghezza del dispositivo e la velocità massima che si osserva è di $1.0134 \cdot 10^{-3} \text{m/s}$. La figura 3.4.1(b)(d) riporta i contours di velocità sul piano medio x-y. Sono evidenziate in blu le due possibili zone di ristagno all'ingresso e all'uscita della zona a sezione costante, all'interno della quale verrà disposta la superficie adesiva.

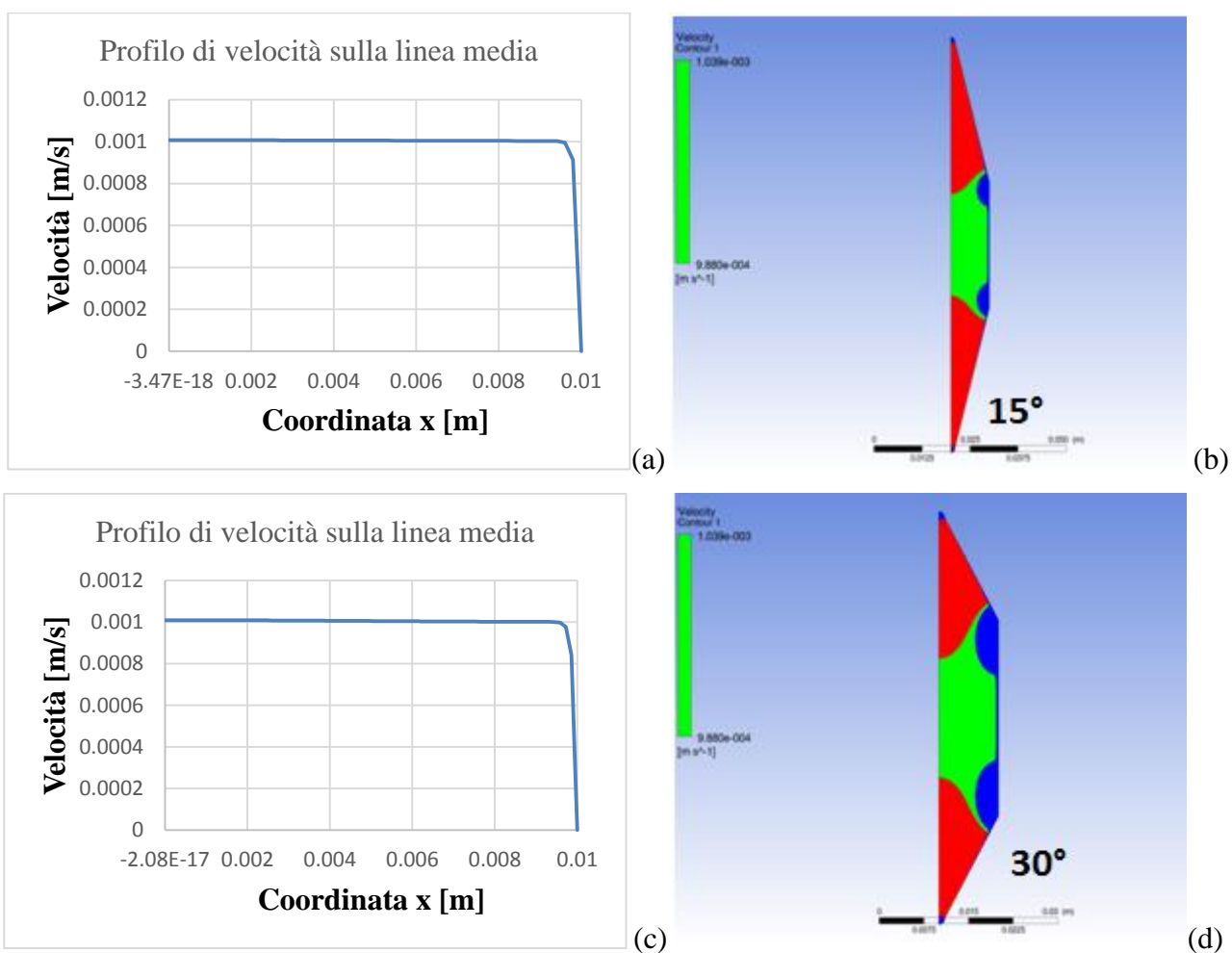


Figura 3.4.1 (a) e (c): Profilo di velocità sulla linea media a metà dell'altezza del dispositivo. (b) e (d) Mappa colore del modulo della velocità sul piano medio x-y con angolo di raccordo 15° e 30° . Sono evidenziate in verde le aree dove la velocità ha valori

compresi in un intervallo del $\pm 2.5\%$ intorno alla velocità massima sulla linea media. Le aree in rosso presentano velocità maggiori, quelle in blu minori.

Poiché la portata non varia il profilo di velocità sulla linea media risulta essere lo stesso per i due casi. Tuttavia dal grafico dei contours dalle mappe di velocità 3.4.1(b) e 3.4.1(d) si deduce che la zona verde (zona in cui i valori di velocità non si discostano più del 2.5% dal valore massimo sulla linea media del dispositivo) è ridotta nel caso di raccordo a 30° rispetto al raccordo a 15° . In Figura 3.4.2 sono riportati rispettivamente i profili di velocità sulla linea media e i grafici dei contours di velocità per i due possibili raccordi nel caso di dimezzamento della portata di trattamento del campione (10 mL in 2h).

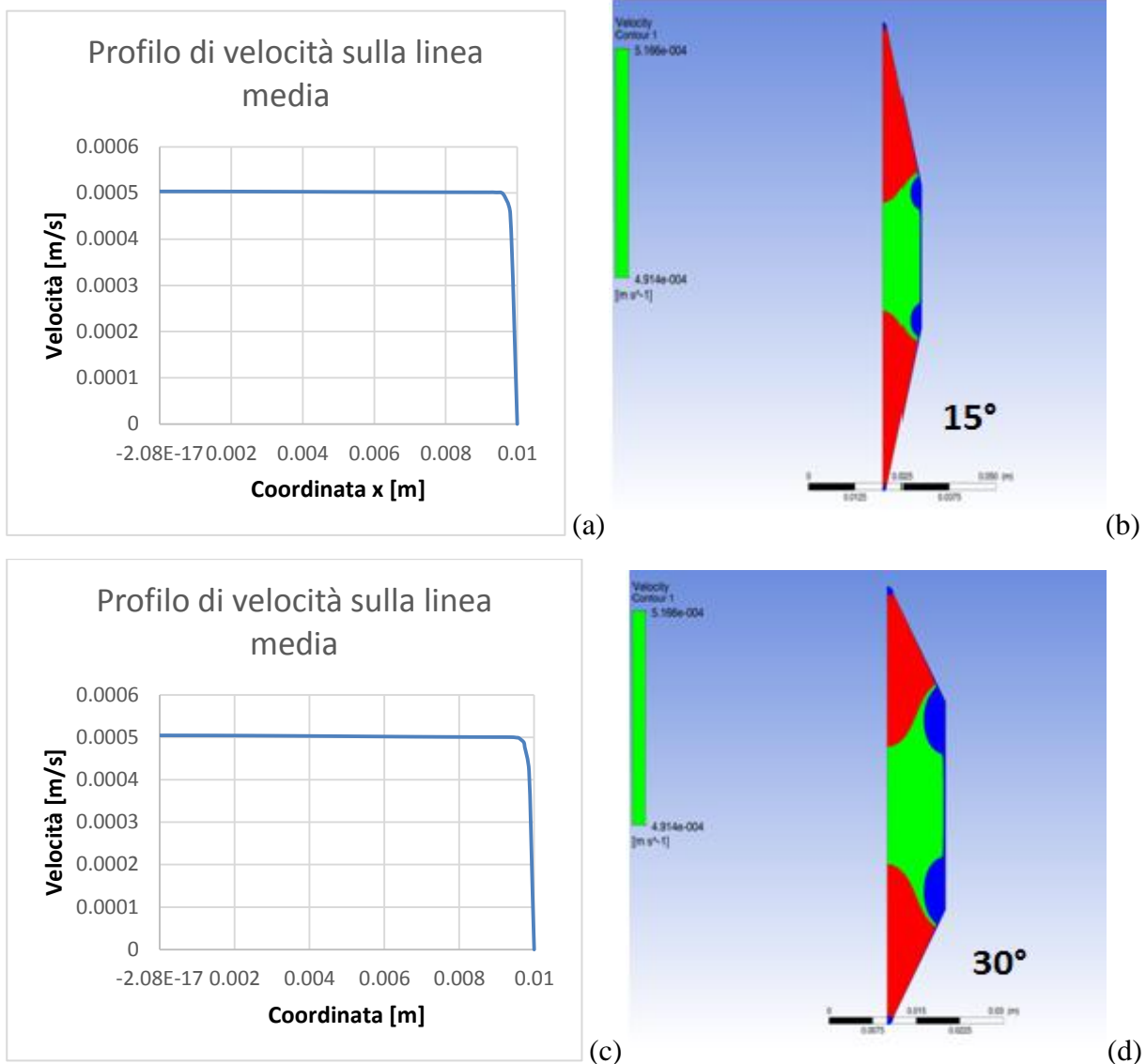


Figura 3.4.2 (a) e (c): Profili di velocità sulla linea media a metà dell'altezza del dispositivo nel caso di dimezzamento della portata di trattamento del campione (10 mL in 2h). (b) e (c): Grafici dei contours di velocità per i raccordi di 15° e 30° nel caso di dimezzamento della portata di trattamento del campione (10 mL in 2h).

Come emerge dal confronto dei grafici non ci sono differenze al variare della portata sull'omogeneità del flusso; in effetti il numero di Reynold è sempre inferiore a 5 identificando un regime laminare.

Focusing orizzontale

Le simulazioni sono state fatte sul dispositivo con angolo di raccordo a 15° e portata di 10 mL in 1h. La portata del canale di focusing orizzontale è $\frac{1}{4}$ rispetto a quella del canale di ingresso. Tale scelta è stata fatta per garantire che la parte occupata dalle cellule copra il 65% della larghezza nella parte centrale della camera in modo tale che nelle zone vicino alle pareti, scorra solo fluido. L'aggiunta di una portata in ingresso fa aumentare la velocità media al centro del dispositivo. In figura 3.4.3 sono riportati i grafici dei contours di velocità per le varie tipologie di focusing orizzontale analizzato.

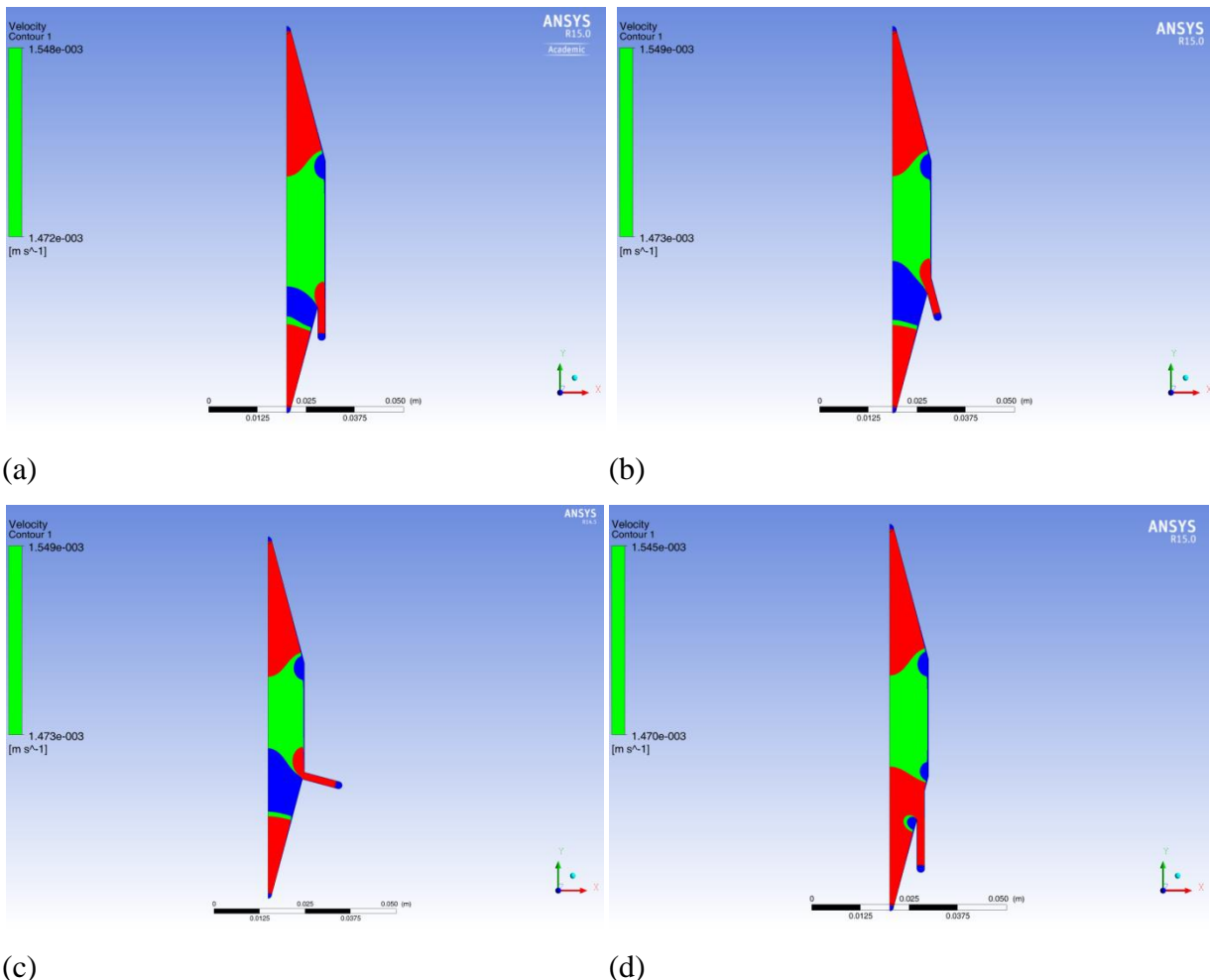


Figura 3.4.3 Mappe colore del modulo di velocità nei casi: (a) Canale di focusing laterale parallelo all'asse y. (b) Canale di focusing laterale inclinato di 15° rispetto all'asse verticale y. (c) Canale di focusing perpendicolare al lato di raccordo del dispositivo. (d) Canale di focusing laterale come nel caso (a) ma posto a monte di 10 mm.

Le zone in cui la velocità assume valori più bassi del valore medio $\pm 2.5\%$ (colorate di blu) sono dovute al fatto che essendo aumentata la velocità al centro per via della portata laterale, esse risultano inferiori al 2.5% rispetto alla nuova velocità media, pur mantenendosi in valore assoluto

uguali al caso senza focusing. E' possibile notare dai grafici che l'ingresso della portata di focusing parallelo alla direzione del flusso e posto all'inizio del divergente (Figura 3.4.3(a)) consente di avere una zona a flusso omogeneo più ampia e di eliminare le zone a bassa velocità (blu) presenti alla fine del divergente in ingresso rispetto agli altri casi considerati.

Nella figura 3.4.4 sono mostrati i grafici delle linee di flusso per i vari ingressi laterali.

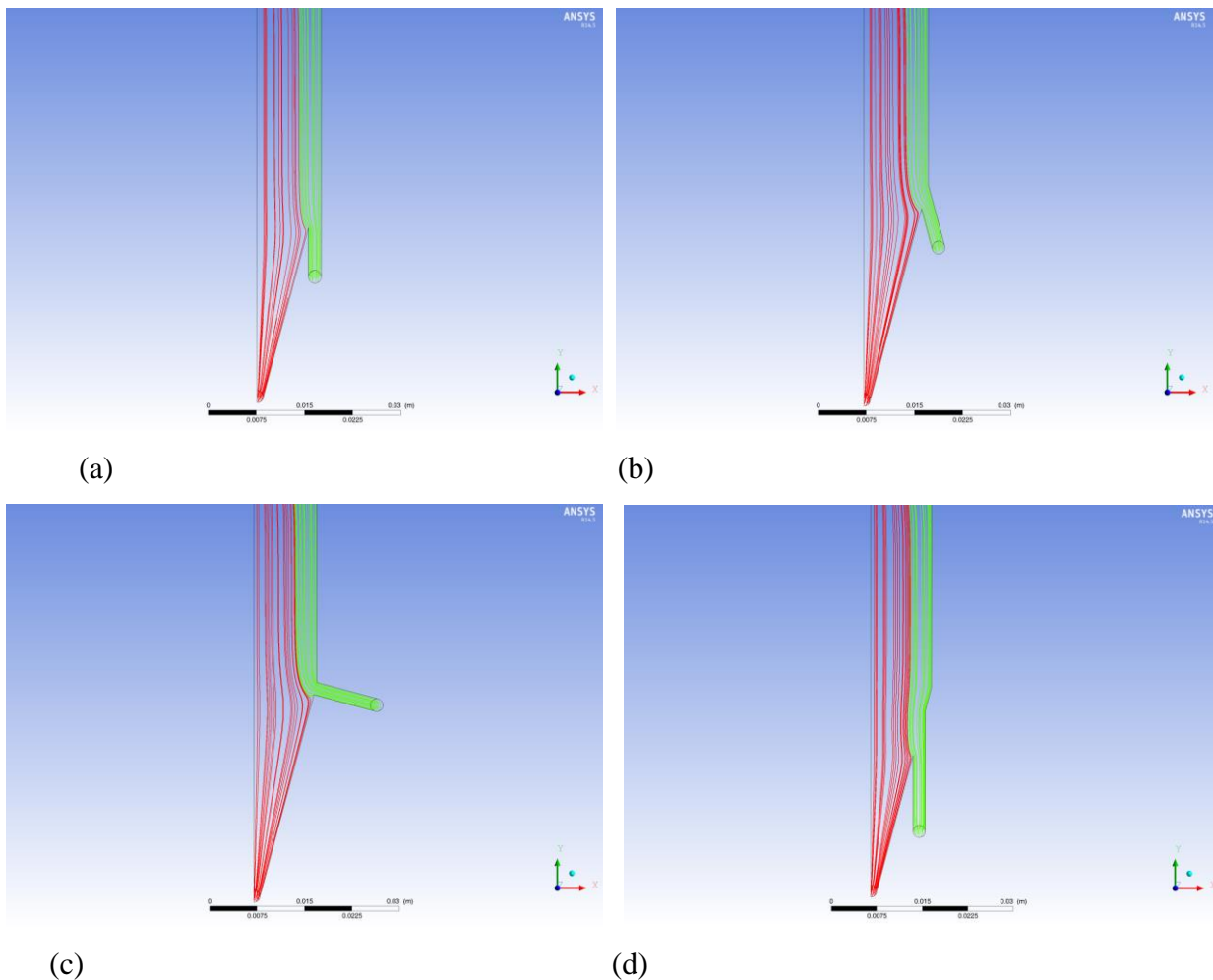


Figura 3.4.4. Linee di flusso nei casi: (a) Canale di focusing laterale parallelo all'asse y. (b) Canale di focusing laterale inclinato di 15° rispetto all'asse verticale y. (c) Canale di focusing perpendicolare al lato di raccordo del dispositivo. (d) Canale di focusing laterale come nel caso (a) ma posto a monte di 10 mm. Il colore rosso identifica il flusso contenente particelle, quello verde il flusso di focusing laterale.

Tra le possibili camerette con focusing laterale (simulate con Fluent) viene scelta quella migliore per omogeneità del flusso e facilità di fabbricazione, ovvero il canale di focusing laterale parallelo all'asse y posto alla fine del divergente di ingresso, e si effettua una simulazione Comsol inserendo le particelle. Come è possibile notare dalla figura 3.4.5 il focusing orizzontale è efficace nell'allontanare le particelle dalle zone prossime alla parete. Questo viene confermato dal confronto tra i grafici di figura 3.4.6 e 3.4.7 che rappresentano la posizione delle particelle nel piano x-z del dispositivo per la coordinata $y=33.588$ mm (inizio zona con aptamero) a $t=100$ s rispettivamente nel caso di assenza e di presenza di focusing orizzontale. Dall'analisi della posizione delle particelle nel

caso di figura 3.4.7 emerge che esse occupano effettivamente il 65% della larghezza centrale del canale, come da specifica imposta.

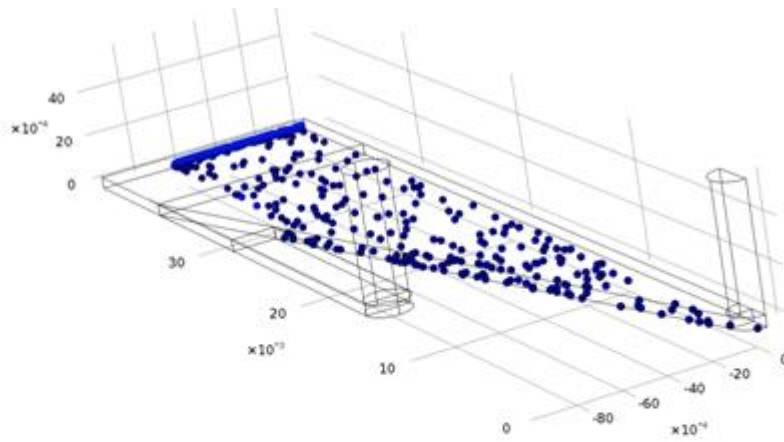


Figura 3.4.5 Immagine tratta dalla simulazione COMSOL del dispositivo con canale di focusing laterale. Le particelle inserite (colorate in blu) sono indirizzate verso il centro del canale grazie alla portata di focusing laterale.

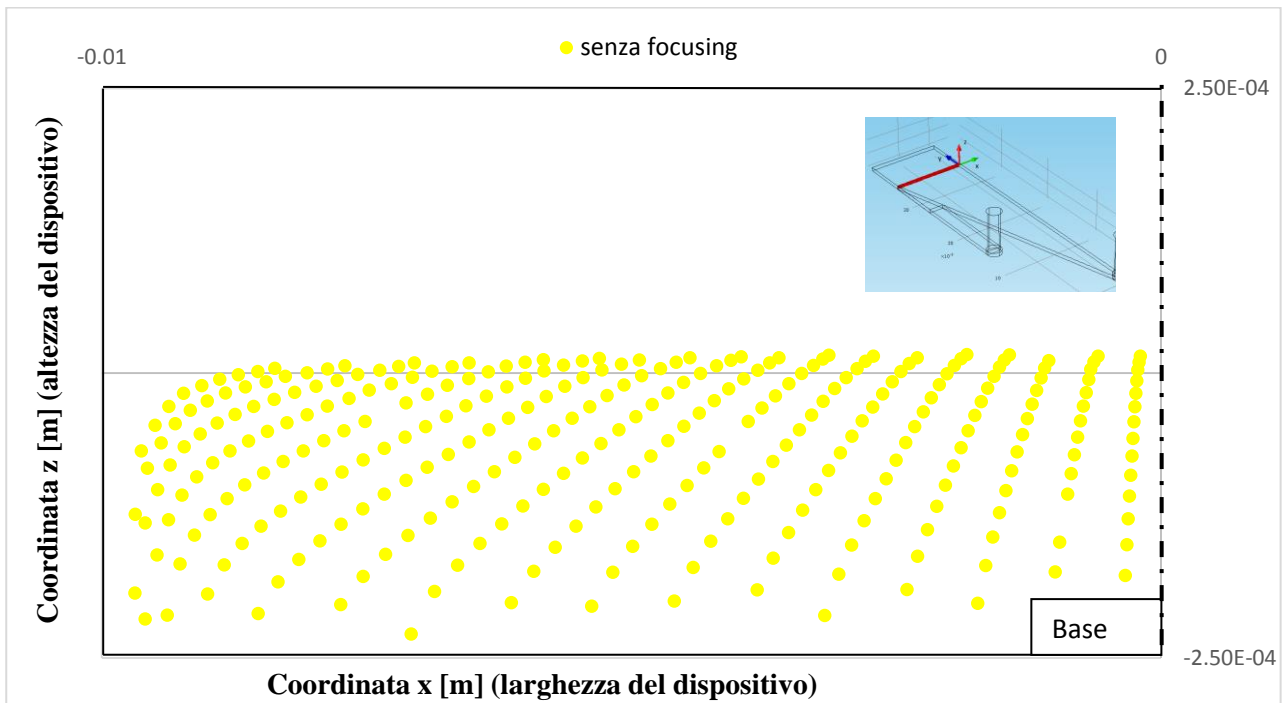


Figura 3.4.6 Posizione delle particelle sul piano x-z del dispositivo alla coordinata y=33.588 mm (inizio della zona adesiva) a 100 s in caso di assenza di focusing laterale.

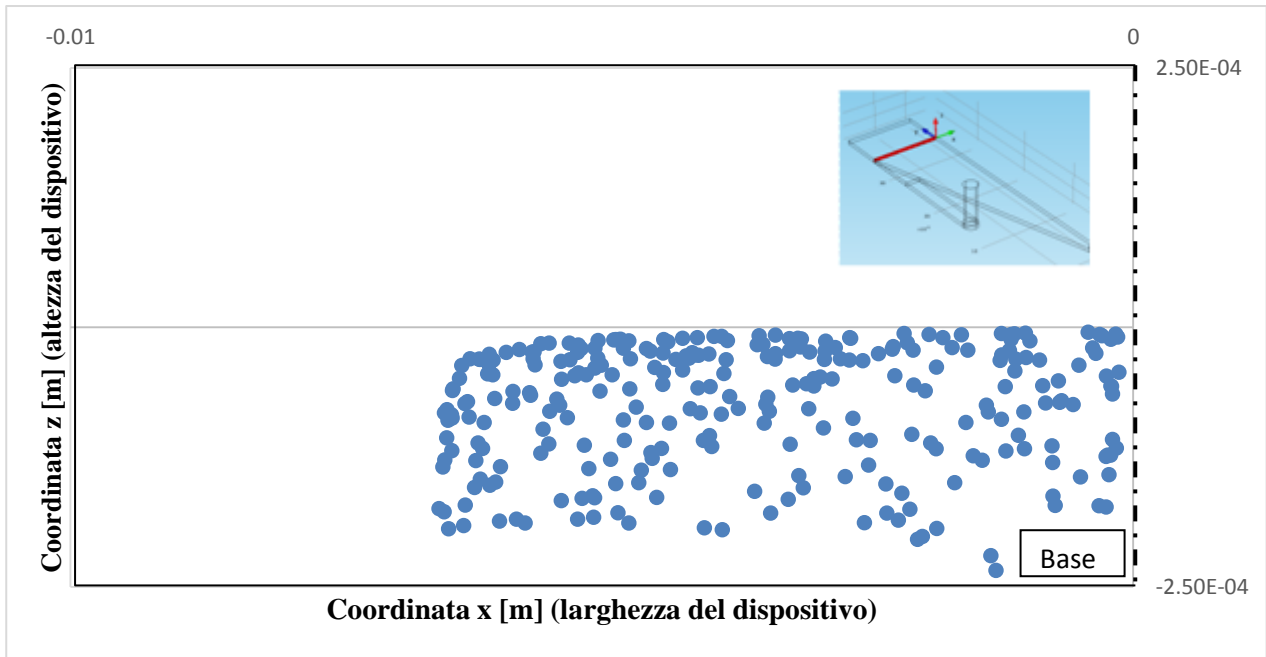


Figura 3.4.7 Posizione delle particelle sul piano x-z del dispositivo alla coordinata y=33.588 mm (inizio della zona adesiva) a 100 s in caso di focusing laterale.

Focusing verticale

Le simulazioni per indagare quale sia la strategia di focusing verticale migliore sono state fatte sul dispositivo con angolo di raccordo a 15° e portata di 10 mL in 1h. Si ripartisce la portata che permette di processare 10 mL in 1h in due terzi nel canale di inlet delle particelle e un terzo in quello del solo fluido.

Vengono riportati i grafici dei contours di velocità in figura 3.4.8 per le tre diverse tipologie di focusing verticale.

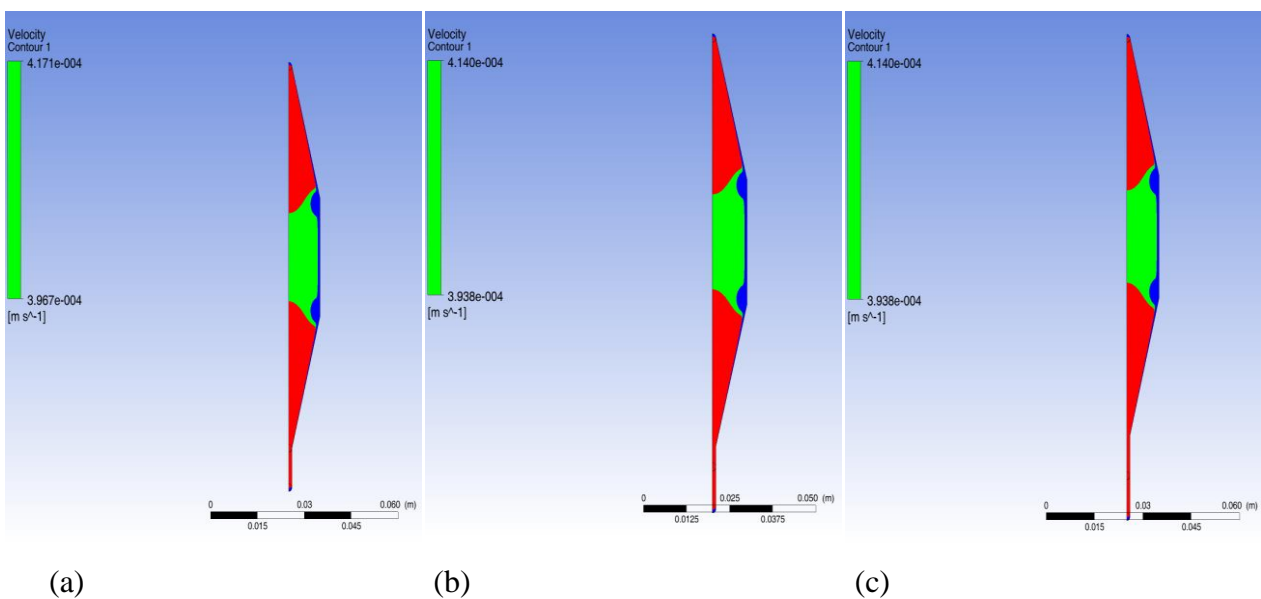


Figura 3.4.8 Mappa colore del modulo della velocità sul piano medio x-y per i tre casi di focusing verticale: canale di focusing verticale posto all'inizio del divergente (a); a una distanza di 5 mm dal divergente (b); a una distanza di 10 mm dal divergente (c).

Sono evidenziate in verde le aree dove la velocità ha valori compresi in un intervallo del $\pm 2.5\%$ intorno alla velocità massima sulla linea media. Le aree in rosso presentano velocità maggiori, quelle in blu minori.

Come emerge dalle mappe colore della figura 3.4.8 non si rilevano differenze nell'omogeneità del flusso tra le tre tipologie di focusing verticale.

In figura 3.4.9 viene riportato il particolare dell'ingresso del canale verticale di focusing dei grafici delle streamline di velocità presi sul piano verticale di simmetria del dispositivo.

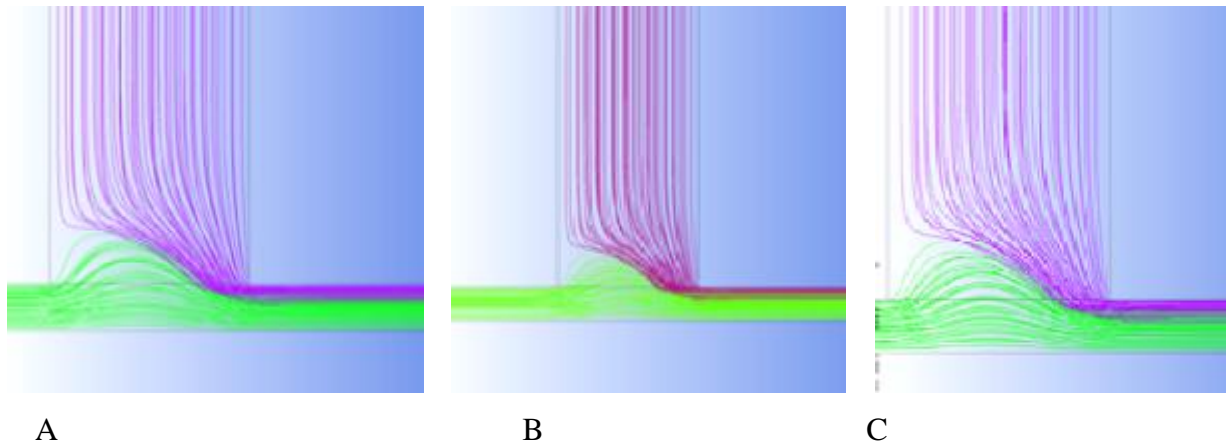


Figura 3.4.9. Particolare del canale di ingresso di focusing verticale nel dispositivo nei tre casi: canale posto all'inizio del divergente (A), posto a 5 mm (B) o a 10 mm (C) da esso. I grafici rappresentano le linee di flusso sul piano verticale y-z di simmetria del dispositivo. In viola sono evidenziate le linee del flusso di focusing verticale, in verde quelle del flusso del campione.

Come emerge dai grafici in figura 3.4.9 il focusing verticale avviene in modo efficace poiché il flusso di focusing schiaccia il flusso contenente le particelle abbassandolo, senza che avvenga mescolamento tra i due. Nella zona centrale del dispositivo non vi sono sostanziali differenze tra le tre possibili geometrie.

Tuttavia il focusing verticale schiaccia il fluido con le particelle verso il basso soprattutto nella zona centrale. Nel caso di canale di focusing posto all'inizio del divergente non ci sono streamline del fluido di focusing vicino alla parete, mentre c'è una maggiore concentrazione delle streamline delle particelle. Nei casi di canale di focusing arretrato, invece, questo fenomeno è meno marcato e il focusing risulta più omogeneo. Non emergono, inoltre, sostanziali differenze tra il canale arretrato di 5 mm e il canale arretrato di 10 mm.

In Comsol viene simulato il moto del fluido e successivamente il moto della fase discreta per indagare l'effetto di tre diversi tipi di focusing verticali sulla sedimentazione delle particelle sul piano x-z a $y=33.588$ mm (inizio della zona trattata con l'aptamero) a 100 s. Nei grafici di figura 3.4.10 e 3.4.11 è possibile vedere la posizione delle particelle su tale piano prima in assenza di focusing verticale e successivamente in presenza delle varie tipologie di focusing.

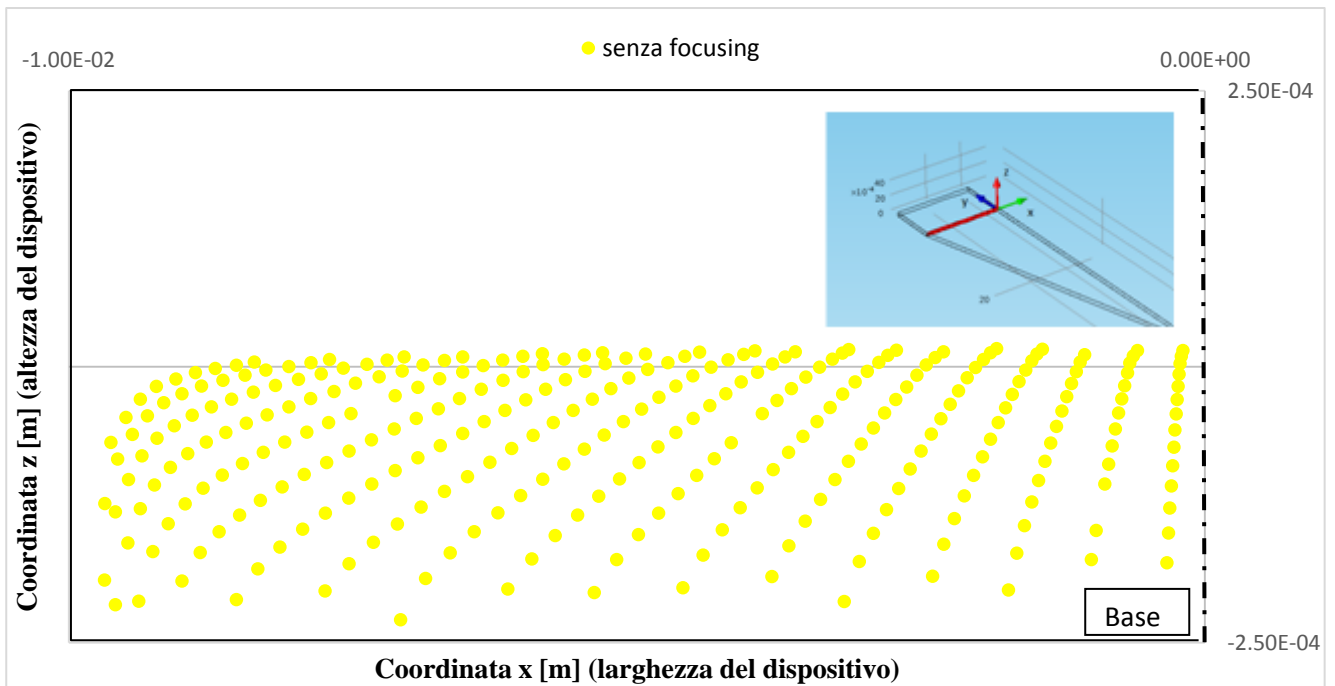


Figura 3.4.10. Posizione delle particelle sul piano x-z del dispositivo alla coordinata $y=33.588$ mm (inizio della zona adesiva) a 100s in assenza di focusing verticale.

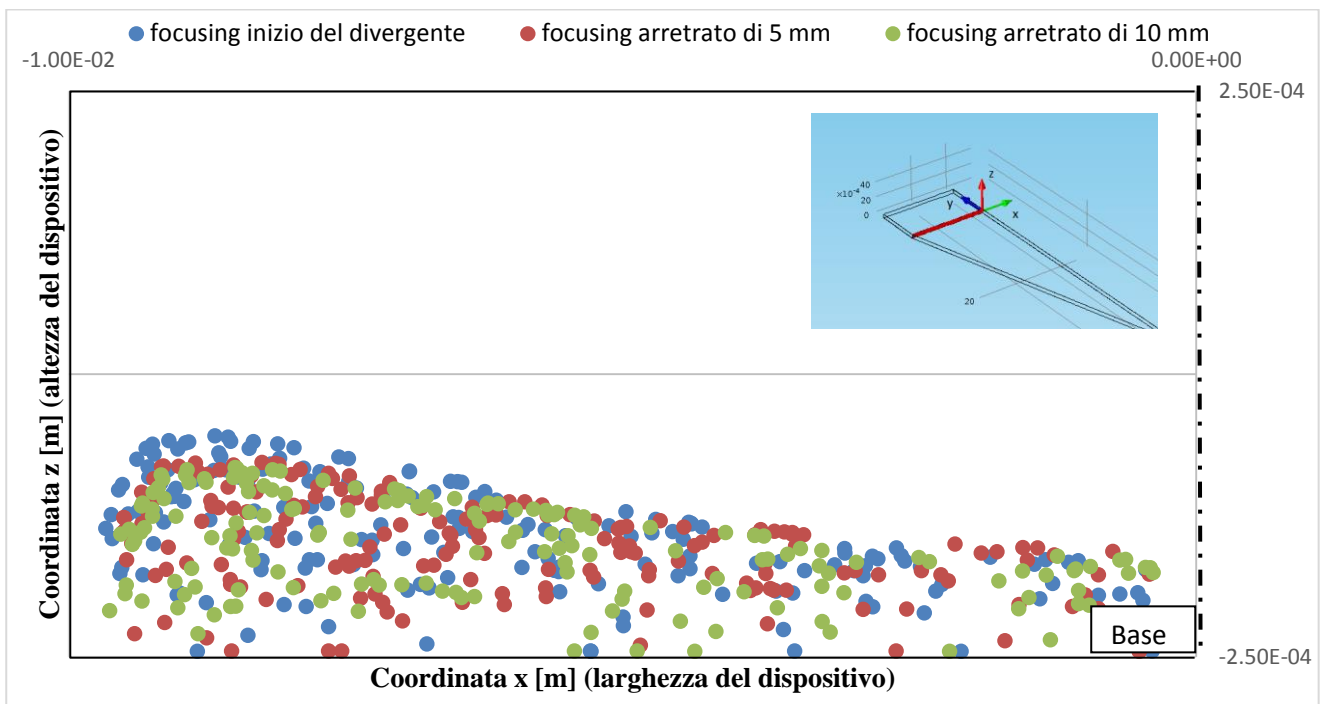


Figura 3.4.11. Posizione delle particelle sul piano x-z del dispositivo alla coordinata $y=33.588$ mm (inizio della zona adesiva) a 100s in presenza dei tre casi di focusing verticale: focusing all'inizio del divergente (particelle colorate in blu), arretrato di 5 mm (rosso) e di 10 mm (verde) rispetto ad esso.

Come emerge dal grafico di figura 3.4.11 la presenza del focusing verticale consente di schiacciare il flusso di particelle a circa $1/5$ del canale al centro e a $1/2$ del canale ai lati. La ripartizione di portate di flussi scelta consente, quindi, un focusing verticale molto accentuato.

L'analisi delle particelle in Comsol, inoltre, conferma quanto osservato con l'analisi della fluidodinamica di Fluent: arretrare di 5 mm il canale di focusing consente di avere un flusso verticale più omogeneo e sviluppato rispetto al caso base (canale di focusing all'inizio del divergente). Non risultano evidenti differenze sulla sedimentazione delle particelle, invece, tra il canale arretrato di 5 mm e quello arretrato di 10 mm.

Analisi del focusing verticale al variare di parametri scelti

Vengono di seguito mostrati i risultati di simulazioni delle particelle con Comsol al variare di alcuni parametri, utilizzando la geometria con raccordo a 15 ° e focusing verticale posto a monte di 5 mm.

VARIAZIONE DELLE VELOCITA' IN INGRESSO

Mantenendo costante a 0.5 il rapporto tra la velocità del flusso del canale di focusing verticale e la velocità del flusso del canale contenente il campione viene fatta variare la velocità massima di ingresso nei due canali come mostrato in tabella 3.4.1. A partire dal caso 1 si aumenta la velocità del 50 % ogni volta. Gli altri parametri sono uguali per le tre simulazioni.

	Caso 1 (vmaxP 1180)	Caso 2 (vmaxP 1770)	Caso 3 (vmaxP 2655)
Velocità massima canale particelle	1180 $\mu\text{m/s}$	1770 $\mu\text{m/s}$	2655 $\mu\text{m/s}$
Velocità massima canale focusing	590 $\mu\text{m/s}$	885 $\mu\text{m/s}$	1327.5 $\mu\text{m/s}$

Tabella 3.4.1 Casi simulati con COMSOL. Il rapporto tra velocità del flusso del canale di focusing e velocità del flusso del canale contenente il campione rimane costante.

In figura 3.4.12 viene riportato il grafico delle particelle nel piano x-z a coordinata y=33.588 mm per le tre simulazioni.

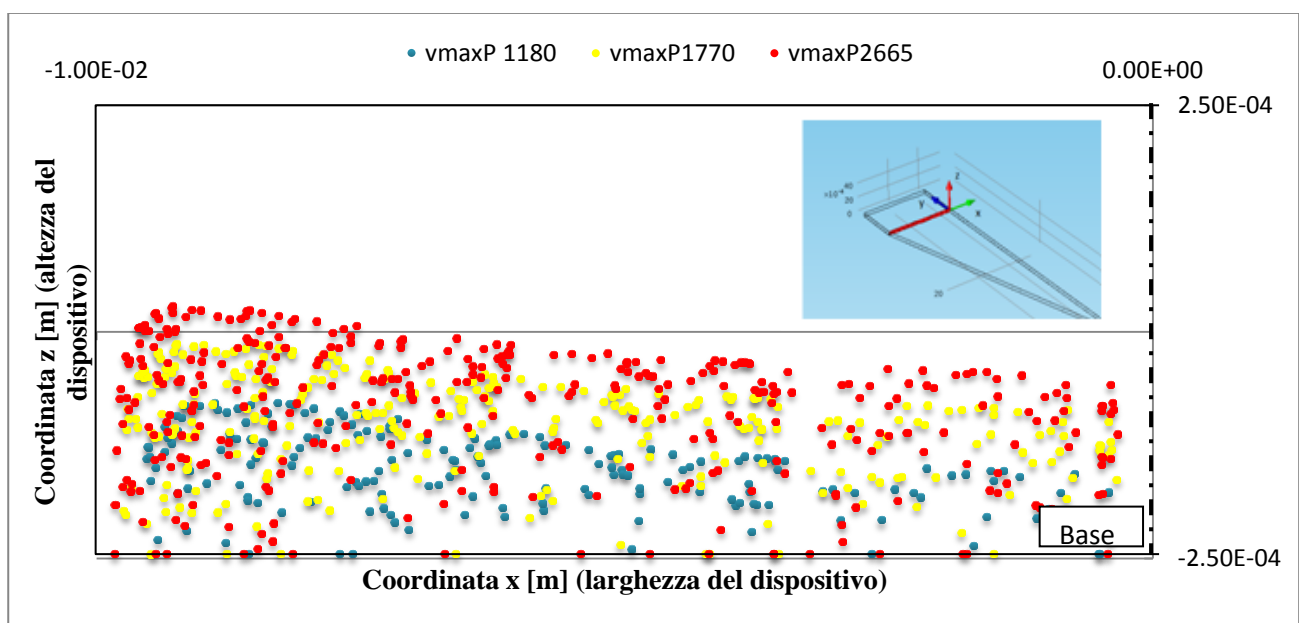


Figura 3.4.12. Posizione delle particelle sul piano x-z del dispositivo alla coordinata y=33.588 mm (inizio della zona adesiva/target) a 100s per i tre casi descritti in tabella 3.4.1.

In tabella 3.4.2 si riporta il numero di particelle totali inserite, quello che raggiunge la coordinata di inizio della zona target e quello che sedimenta. Le particelle NaN sono quelle di cui il programma non riesce a fornire le coordinate. Le particelle arrivate sono quelle che hanno oltrepassato la coordinata $y=33.588$ mm.

	Totali	Arrivate su target	Sedimentate pre-target	NaN
Caso 1(vmaxP 1180)	542	100	351	8
Caso2 (vmaxP 1770)	543	281	273	7
Caso3 (vmaxP 2665)	543	355	199	7

Tabella 3.4.2 Numero di particelle totali inserite, arrivate all'inizio della zona target, sedimentate prima della zona target e NaN per i tre casi simulati.

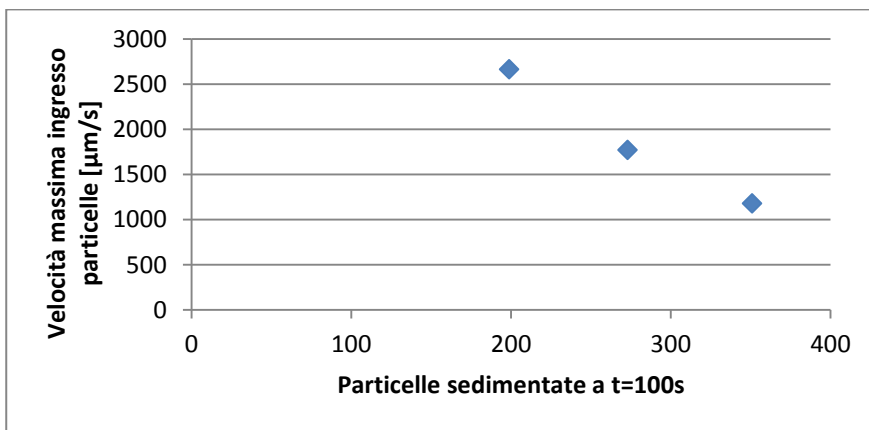


Figura 3.4.13. Particelle sedimentate pre-target a $t=100\text{s}$ in funzione della velocità massima in ingresso del fluido contenente le particelle

Dai dati analizzati e raffigurati nelle figure 3.4.12/13 emerge che al diminuire delle velocità di ingresso dei fluidi il numero di particelle sedimentate aumenta. Questo fenomeno è dovuto al fatto che velocità più basse riducono la componente orizzontale del flusso e permettono al campione contenente le cellule di sedimentare maggiormente.

VARIAZIONE RAPPORTI PORTATE FOCUSING VERTICALE

Vengono condotte simulazioni mantenendo invariata la portata del fluido con le particelle (1180 $\mu\text{m/s}$) e facendo variare la portata del solo fluido di buffer come descritto in tabella 3.4.3.

	Caso1	Caso2	Caso3	Caso4
Velocità massima del fluido di buffer all'ingresso	590 $\mu\text{m/s}$	295 $\mu\text{m/s}$	885 $\mu\text{m/s}$	1180 $\mu\text{m/s}$
portata fluido / portata particelle	0.5	0.25	0.75	1

Tabella 3.4.3. Casi analizzati: viene variato il rapporto tra la portata di fluido di buffer e la portata di fluido contenente il campione cellulare mantenendo fissa la velocità massima all'ingresso del fluido contenente le particelle.

In figura 3.4.1.14. viene riportato il grafico della posizione delle particelle a $t=100s$ sul piano x-z a coordinata $y=33.588$ mm.

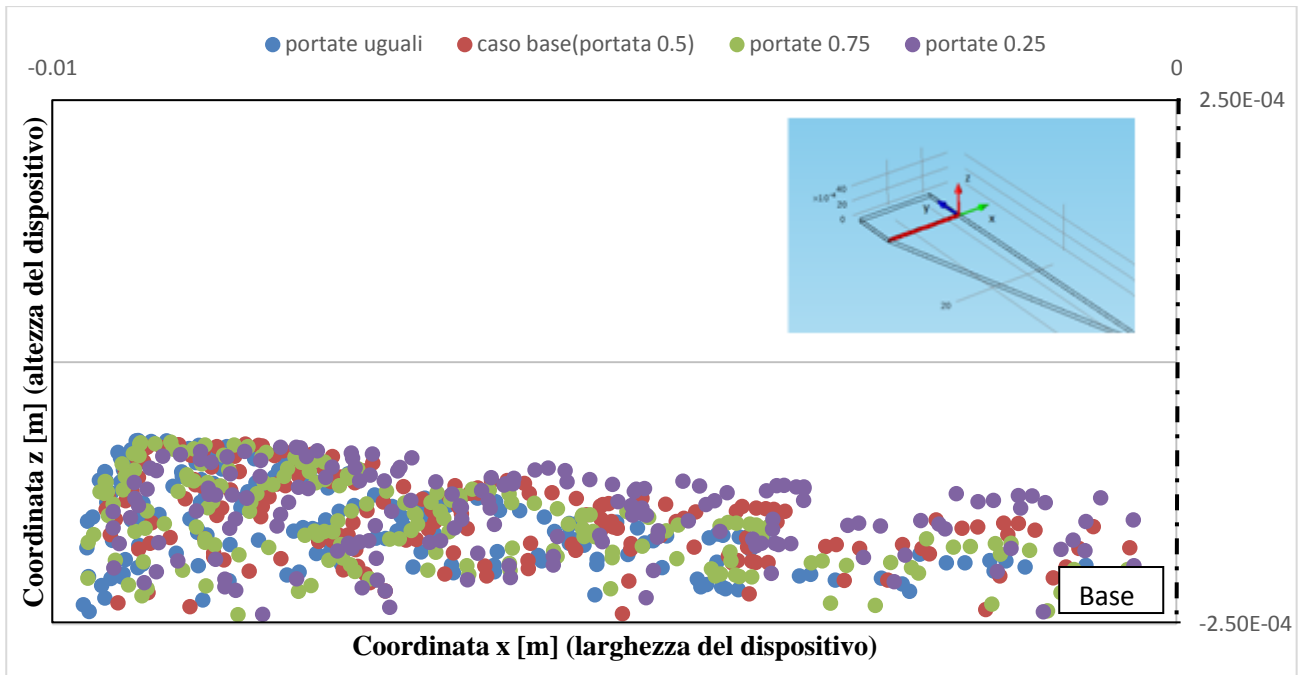


Figura 3.4.14. Posizione delle particelle sul piano x-z del dispositivo alla coordinata $y=33.588$ mm (inizio della zona adesiva) a 100s per i quattro casi descritti in tabella 3.4.3. Le particelle rosse corrispondono al caso 1, le viola al caso 2, le verdi al caso 3 e le blu al caso 4.

Dal grafico emerge che all'aumentare del rapporto tra le portate dei due flussi il focusing verticale risulta più accentuato, ovvero le particelle risultano schiacciate maggiormente verso il basso. Questo fenomeno si verifica solo nella parte centrale del canale, mentre nelle zone laterali non ci sono differenze marcate al variare dei rapporti di portate. Tuttavia nelle zone laterali adiacenti alle pareti del dispositivo finale non sarà presente alcuna componente cellulare, ma solo fluido di buffer proveniente dal canale di focusing orizzontale.

VARIAZIONE DELLA DENSITA' DELLE PARTICELLE

Vengono condotte simulazioni variando la densità delle particelle. Il rapporto tra la portata di focusing verticale e la portata canale con le particelle è 0.5. Le particelle rilasciate in ingresso sono 550. Si riporta nel grafico di figura 3.4.15 la posizione delle particelle sul piano x-z a coordinata $y=33.588$ mm a $t=100s$ e si valutano quante particelle devono ancora sedimentare e quante sono già sedimentate.

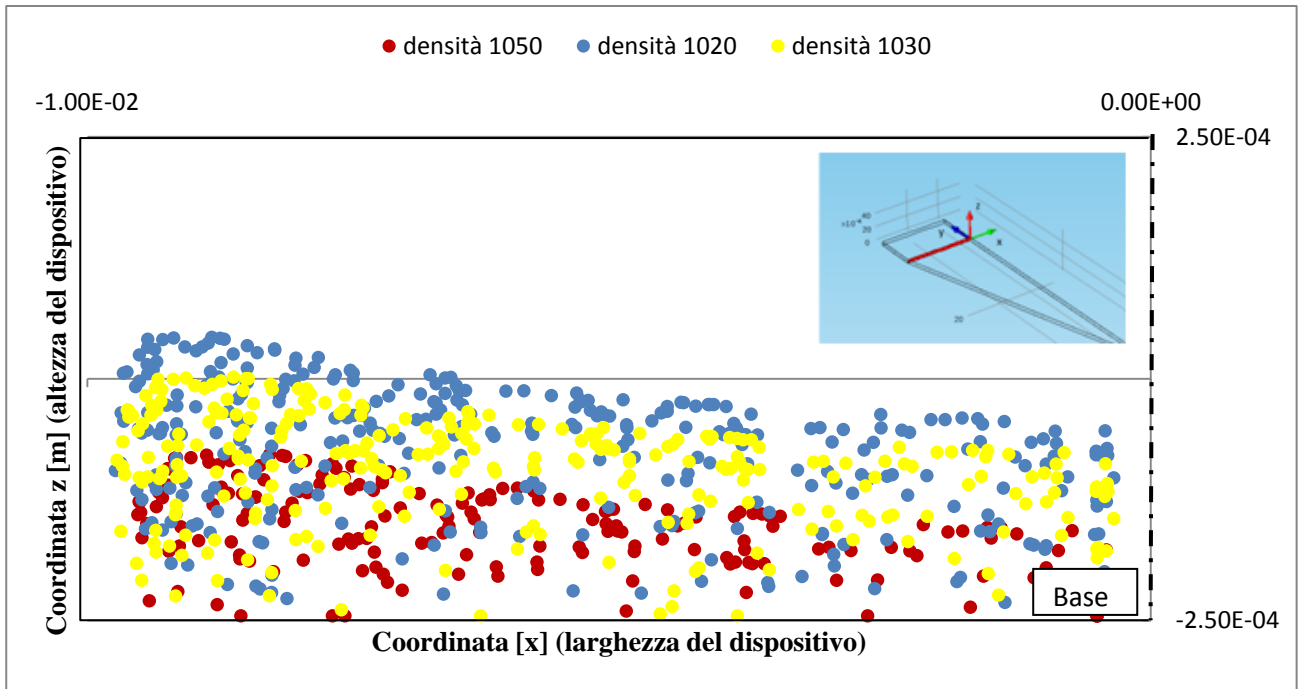


Figura 3.4.15. Posizione delle particelle sul piano x-z del dispositivo alla coordinata $y=33.588$ mm (inizio della zona adesiva) a 100s per simulazioni COMSOL effettuate variando il valore di densità delle particelle [Kg/m^3]: 1050 (colore rosso), 1030 (giallo) e 1020 (blu).

In tabella 3.4.4. viene riportato il numero di particelle totali inserite, sedimentate prime della zona target (zona adesiva) e NaN nei tre casi analizzati.

Densità [kg/m^3]	Totale	Sedimentate pre-target	NaN
1020	542	156	8
1030	542	227	8
1050	543	351	7

Tabella 3.4.4 Numero di particelle totali inserite, sedimentate pre-target e NaN per i tre casi di differente densità simulati.

Come si evince dalla figura 3.4.16. esiste un legame lineare tra il numero di particelle che sedimentano entro una determinata zona e la densità delle particelle.

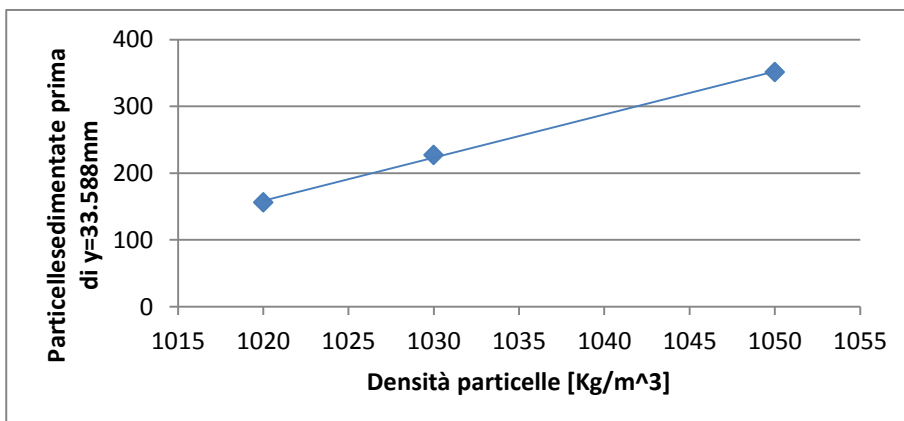


Figura 3.4.16. Numero di particelle sedimentate prima di raggiungere la coordinata $y=33.588$ mm al variare della densità.

I risultati delle simulazioni effettuate per diverse densità dimostrano l'effetto che può avere questo parametro nel determinare il comportamento delle particelle. Nell'ottica della progettazione finale del dispositivo si dovrà tenere in conto che la densità del campione potrebbe variare intorno ai valori di 1030 Kg/m^3 , influenzando la sedimentazione di esso nella zona adesiva.

VARIAZIONE DIAMETRI PARTICELLE

Per analizzare il comportamento di tipi di particelle con dimensioni differenti (ad esempio cellule staminali e piastrine o globuli rossi) nel canale vengono condotte simulazioni variando il diametro delle particelle.

Impostando una densità delle particelle di 1050 kg/m^3 e mantenendo invariati gli altri parametri di simulazione viene messo a confronto il comportamento di particelle con diametro di $10 \mu\text{m}$ con quello di particelle con diametro di $5 \mu\text{m}$.

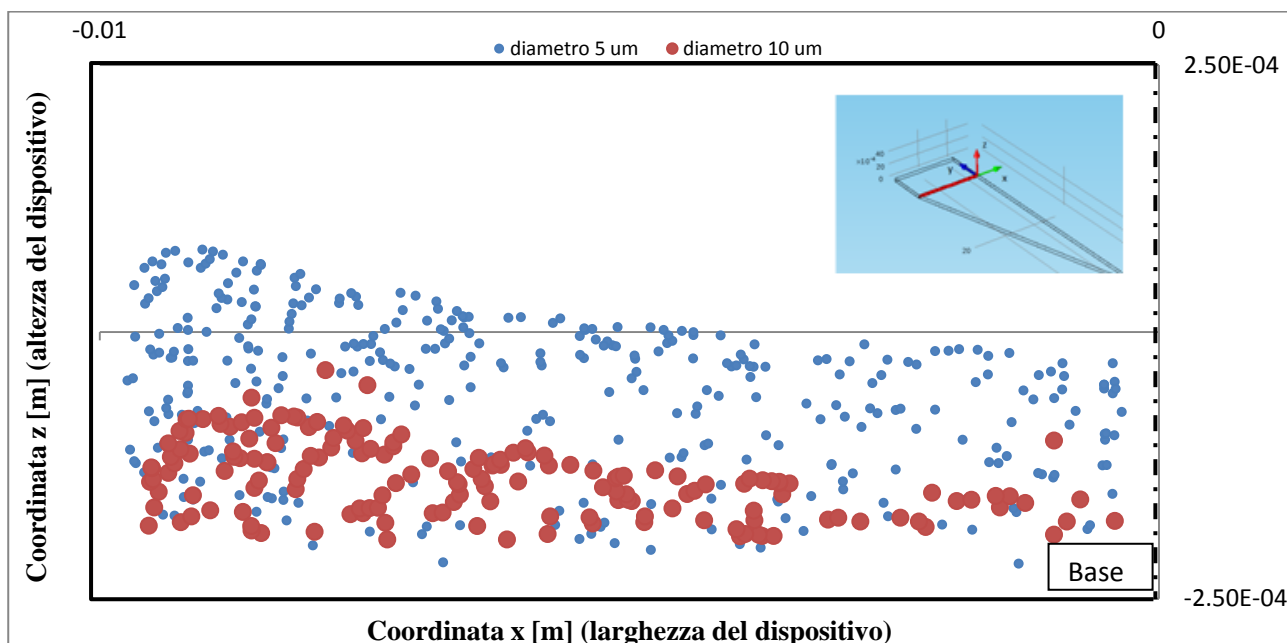


Figura 3.4.17. Grafico della posizione delle particelle a 100s nel piano x-z con coordinata y del dispositivo uguale a 33.588 mm. I pallini blu indicano le particelle di diametro di $5 \mu\text{m}$, quelli rossi le particelle di diametro di $10 \mu\text{m}$. Le particelle hanno una densità di 1050 kg/m^3 .

Diametro [μm]	Totali	Sedimentate pre-target	Arrivate su target	NaN
5	550	87	361	9
10	550	352	181	7

Tabella 3.4.5 Numero di particelle totali inserite, sedimentate pre-target, arrivate sulla zona target e NaN per particelle di diametro di 5 e $10 \mu\text{m}$. Le particelle hanno una densità di 1050 kg/m^3 .

Dalla figura 3.4.17 e dai dati in tabella 3.4.5. è possibile notare come le particelle con diametro minore sedimentano più lentamente, arrivano a $y=33.588$ mm (inizio della parte del canale con substrato) con una quota più alta.

Vengono condotte simulazioni analoghe alla precedente, ma impostando una densità delle particelle di 1030 kg/m^3 .

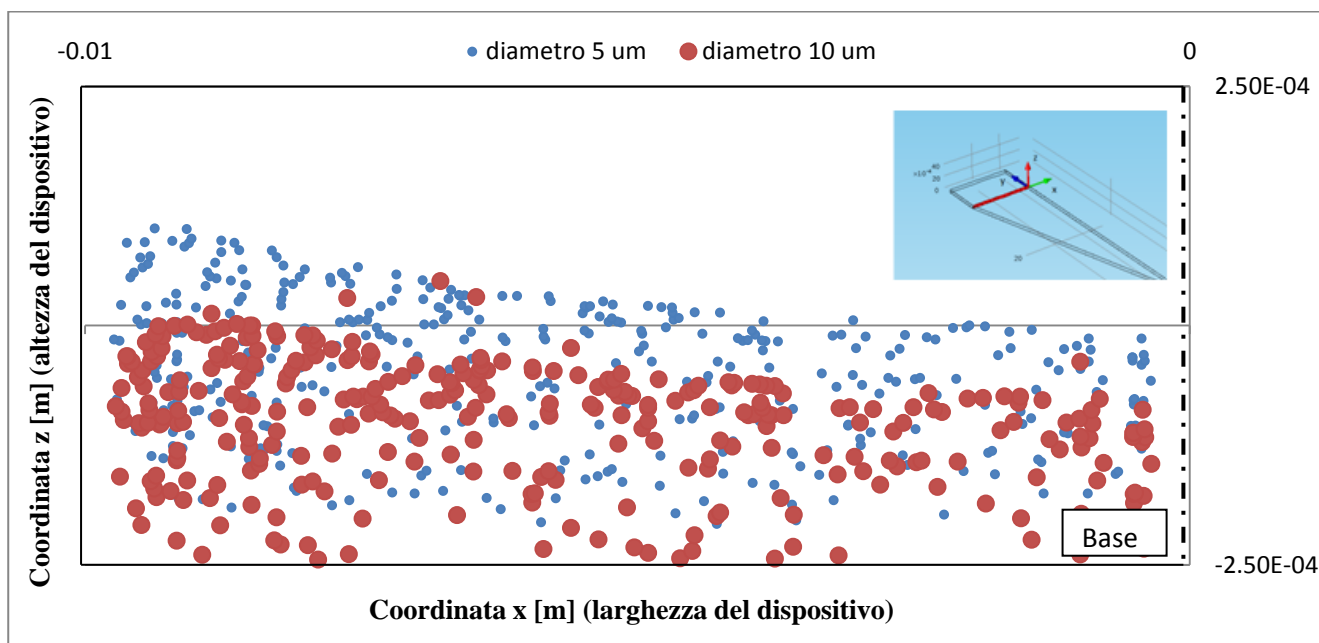


Figura 3.4.18 Grafico della posizione delle particelle a 100s nel piano x-z con coordinata y del dispositivo uguale a 33.588 mm. I pallini blu indicano le particelle di diametro di $5 \mu\text{m}$, quelli rossi le particelle di diametro di $10 \mu\text{m}$. Le particelle hanno una densità di 1030 kg/m^3 .

Diametro [μm]	Totali	Sedimentate pre-target	Arrivate su target	NaN
5	550	43	377	8
10	550	228	280	8

Tabella 3.4.6 Numero di particelle totali inserite, sedimentate pre-target, arrivate sulla zona target e NaN per particelle di diametro di 5 e $10 \mu\text{m}$. Le particelle hanno una densità di 1030 kg/m^3 .

Anche in questo caso, come mostra la figura 3.4.18 e i dati di tabella 3.4.6 le particelle con diametro minore cadono più lentamente. Nel complesso le particelle sedimentate sono inferiori rispetto al caso con densità 1050 kg/m^3 .

SIMULAZIONI CON DATI SPERIMENTALI

Prendendo come riferimento due istogrammi delle frequenze relative della distribuzione dei diametri cellulari (figure 3.4.19 e 3.4.21) ricavati sperimentalmente vengono condotte due

simulazioni rappresentanti il campione che ha seguito il protocollo Standard/Filtrato e il campione che ha subito il protocollo di Lisi.

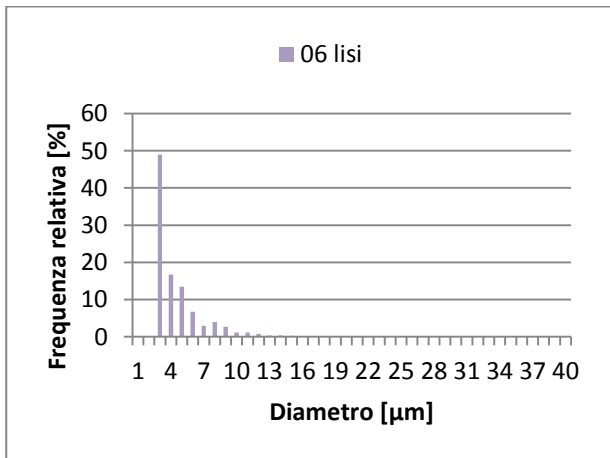


Figura 3.4.19. Istogramma della frequenza relativa percentuale di distribuzione dei diametri cellulari del campione 06 trattato con protocollo di lisi preso come riferimento nella simulazione computazionale.

Per la simulazione rappresentante il campione lisato seguendo le percentuali dell'istogramma di riferimento le 550 particelle vengono suddivise nel seguente modo:

Diametro 4 μm	445 particelle
Diametro 7 μm	77 particelle
Diametro 10 μm	28 particelle

Tabella 3.4.7 Numero di particelle inserite per diametro.

Si riporta nel grafico di figura 3.4.20 la posizione delle particelle sul piano x-z a coordinata y=33.588 mm al t=100s.

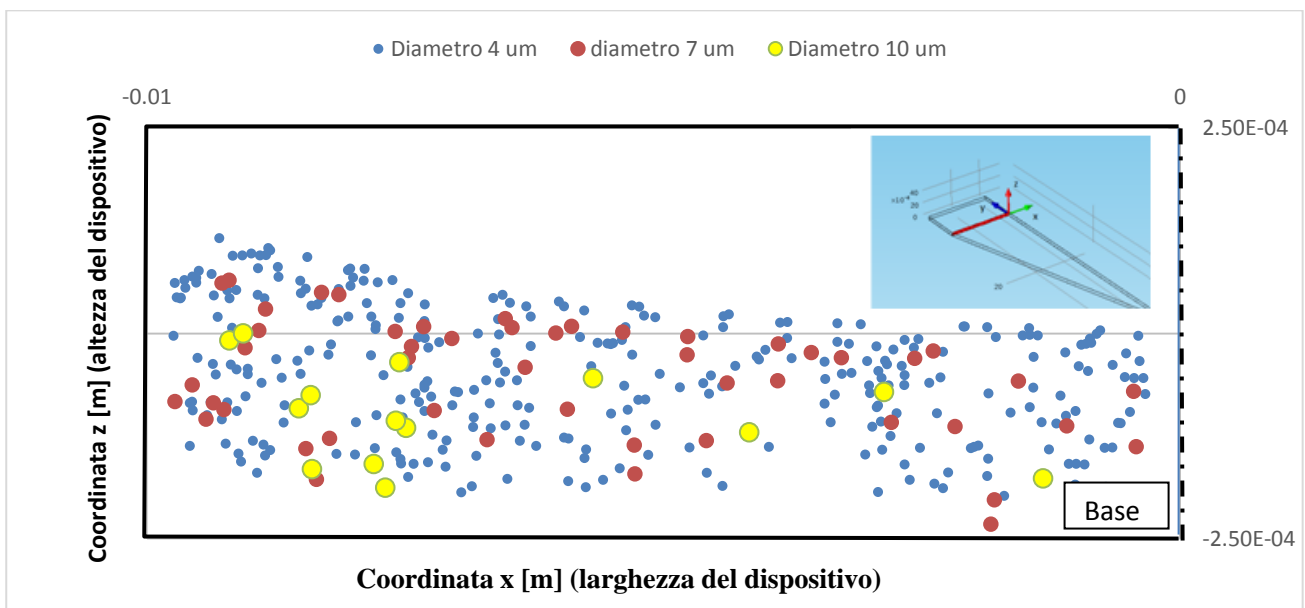


Figura 3.4.20 Grafico della posizione delle particelle a 100s nel piano x-z con coordinata y del dispositivo uguale a 33.588 mm. I pallini blu indicano le particelle di diametro di 4 μm, quelli rossi le particelle di diametro di 7 μm, quelle gialle le particelle con diametro 10 μm.

In tabella 3.4.8 viene riportata la percentuale di particelle sedimentate e arrivate (particelle che hanno oltrepassato la coordinata $y=33.588$ mm) a $t=100$ s per il campione sottoposto al protocollo di Lisi.

Diametro [μm]	Percentuale Sedimentate [%]	Percentuale Arrivate su Target [%]
4	4.04	67.42
7	25.97	62.34
10	42.8	46.42

Tabella 3.4.8 Percentuale di particelle sedimentate e percentuale di particelle arrivate all'inizio della zona target sul totale di particelle inserite per diametro a $t=100$ s.

Il fatto che il 42.8% delle cellule che si vogliono far interagire con l'aptamero (diametro 10 μm) cada prima della zona target non pregiudica l'interazione con quest'ultimo in quanto le particelle sedimentate se non coinvolte in legami aspecifici con la superficie del canale, rotoleranno con la velocità del fluido alla base del dispositivo fino a raggiungere la zona target. Parte di questa percentuale infatti cade a una coordinata prossima ai 33.588 mm. Il restante 57.2% di cellule che invece non sono ancora sedimentate, probabilmente cadranno nella zona target poiché la maggior parte di esse si trova a un'altezza prossima alla base del dispositivo (si trovano nella metà inferiore del dispositivo). (Figura 3.4.20) Il calcolo analitico condotto a partire dalla conoscenza della velocità delle particelle all'inizio della zona target permetterebbe di prevedere in modo rigoroso a che distanza sedimentano. La maggior parte delle particelle di diametro di 4 μm non sedimenta prima della zona target e considerando il grafico di Figura 3.4.20 si presume che parte di esse non sedimenterà nella zona target. Questo fatto sarebbe positivo in quanto non si desidera che esse vengano a contatto con l'aptamero poiché non rappresentano cellule che si vogliono selezionare. Considerazioni analoghe possono essere fatte per le particelle di diametro 7 μm .

Per la simulazione rappresentante il campione Standard/Filtrato si seguono le percentuali dell'istogramma di riferimento (Figura 3.4.21). In questo caso nel campione la componente di diametro 7 μm (circa equivalente alla dimensione dei globuli rossi del campione) è quella maggiormente presente al contrario del caso lisato dove è la componente di 4 μm quella prevalente (derivata dalla lisi dei globuli rossi).

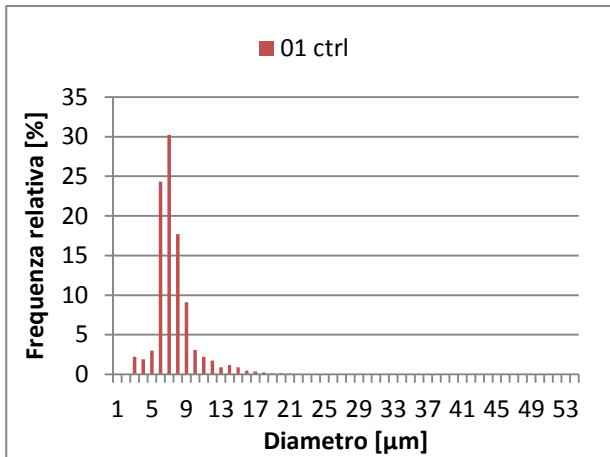


Figura 3.4.21 Istogramma della frequenza relativa percentuale di distribuzione dei diametri cellulari del campione 01 trattato con protocollo Standard preso come riferimento nella simulazione computazionale.

Le 550 particelle vengono pertanto suddivise nel seguente modo:

Diametro 4 µm	42 particelle
Diametro 7 µm	423 particelle
Diametro 10 µm	85 particelle

Tabella 3.4.9 Numero di particelle inserite per diametro.

Si riporta nel grafico di figura 3.4.22 la posizione delle particelle sul piano x-z a coordinata $y=33.588$ mm al $t=100$ s.

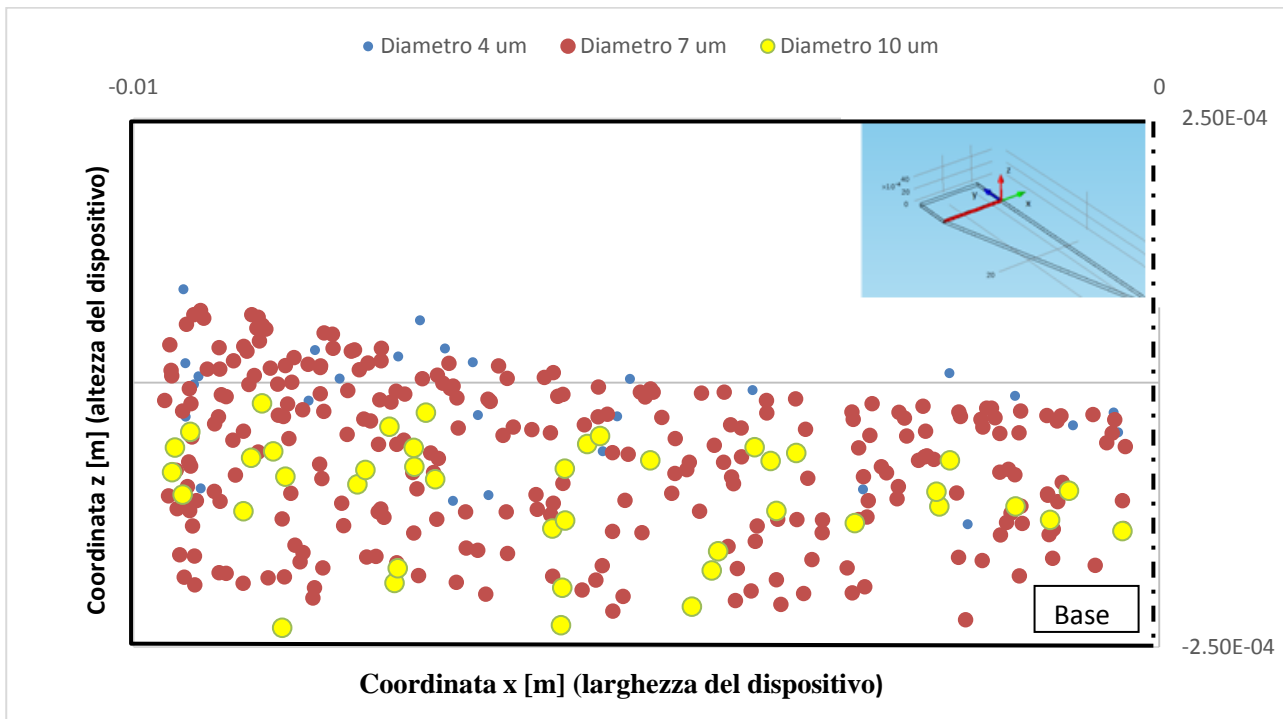


Figura 3.4.22 Grafico della posizione delle particelle a 100 s nel piano x-z con coordinata y del dispositivo uguale a 33.588 mm. I pallini blu indicano le particelle di diametro di 4 µm, quelli rossi le particelle di diametro di 7 µm, quelli gialli le particelle con un diametro 10 µm.

In tabella 3.4.10 viene riportata la percentuale di particelle sedimentate e arrivate (particelle che hanno oltrepassato la coordinata $y=33.588$ mm) a $t=100$ s.

Diametro [μm]	Percentuale Sedimentate [%]	Percentuale Arrivate [%]
4	4.76	64.28
7	18.20	63.83
10	42.35	48.23

Tabella 3.4.10 Percentuale di particelle sedimentate e percentuale di particelle arrivate all'inizio della zona target sul totale di particelle inserite per diametro.

Le percentuali delle particelle sedimentate pre-target e arrivate al target delle diverse componenti cellulari sono simili a quelle ottenute con la simulazione del protocollo lisato. Si possono perciò dedurre considerazioni analoghe al caso precedentemente analizzato.

Fluidodinamica della geometria finale

Infine si conduce una simulazione su Fluent del dispositivo finale con la geometria di base con raccordo di 15° , dotato di canale di focusing laterale parallelo alla direzione del flusso e canale di focusing verticale a distanza di 5 mm rispetto all'inizio del divergente. La portata inserita nel canale di focusing laterale è $\frac{1}{4}$ della somma delle portate negli altri due canali. La portata inserita nel canale di focusing verticale è la metà di quella inserita nel canale di ingresso di campione. In figura 3.4.23 viene riportato il profilo di velocità sulla linea media a metà dell'altezza del dispositivo.

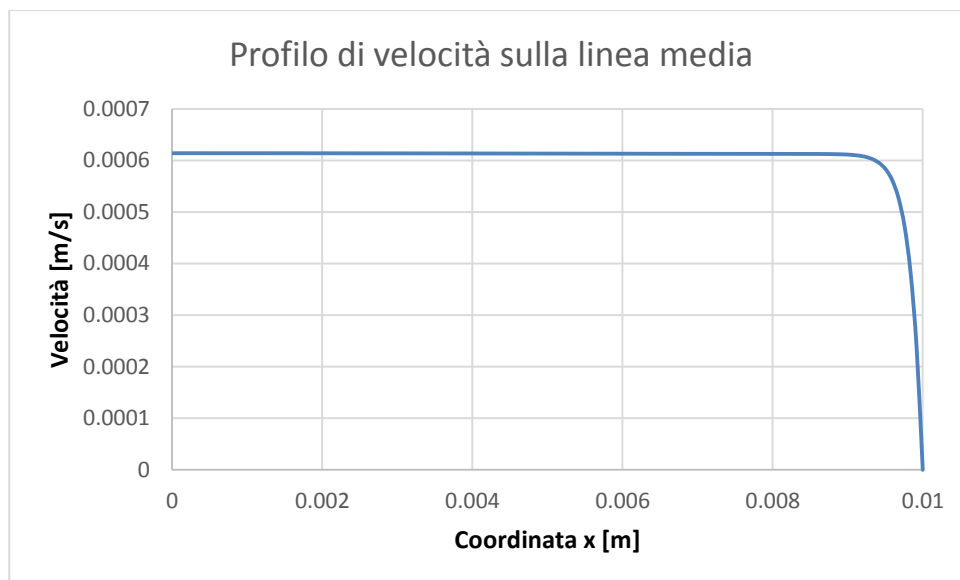


Figura 3.4.23. Grafico del profilo di velocità in funzione della coordinata x preso sulla linea media del dispositivo finale a metà altezza.

In figura 3.4.24 viene mostrato il grafico dei contours di velocità del piano medio del dispositivo perpendicolare all'asse z .

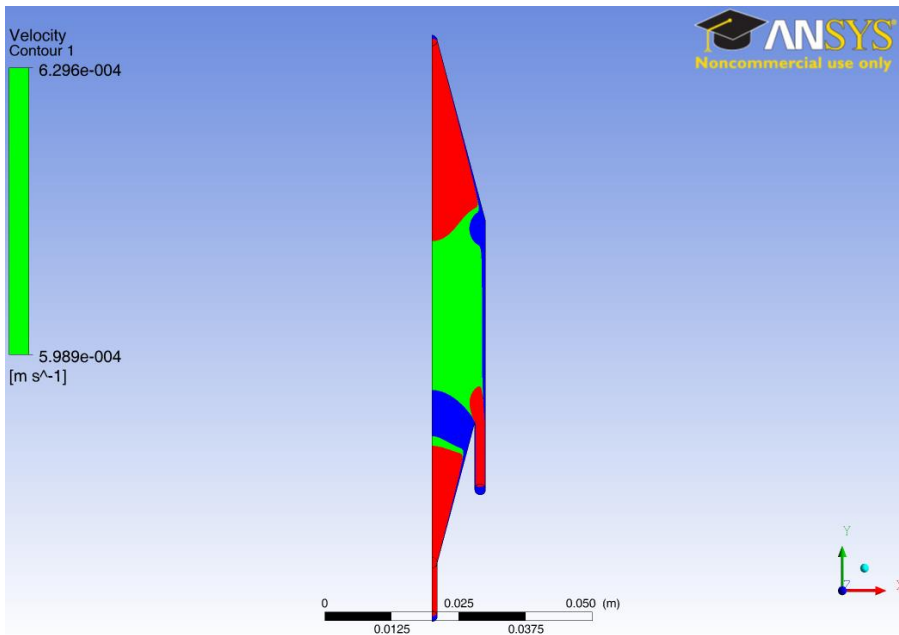


Figura 3.4.24. Mappa colore del modulo della velocità sul piano medio x-y del dispositivo finale. Sono evidenziate in verde le aree dove la velocità ha valori compresi in un intervallo del $\pm 2.5\%$ intorno alla velocità massima sulla linea media. Le aree in rosso presentano velocità maggiori, quelle in blu minori.

Come emerge dal grafico la zona verde che rappresenta la regione dove il flusso è omogeneo (variazione della velocità entro il 2.5 % rispetto al valore massimo rilevato sulla linea media) è ampia e interessa la zona rettangolare che verrà ricoperta con l'aptamero.

In figura 3.4.25 viene riportato il grafico delle streamline di velocità all'imbocco del canale di focusing verticale.

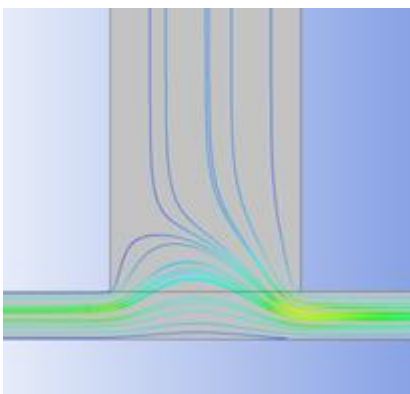


Figura 3.4.25. Linee di flusso del modulo di velocità all'imbocco del canale di focusing verticale.

Come si può osservare il focusing verticale avviene in modo efficace poiché il flusso di focusing schiaccia il flusso contenente le particelle abbassandolo, senza che avvenga mescolamento tra i due. Infine nel grafico di figura 3.4.25 vengono mostrate con colori diversi i flussi del fluido del canale principale (rosso), del canale di focusing verticale (azzurro) e del canale di focusing orizzontale (verde).

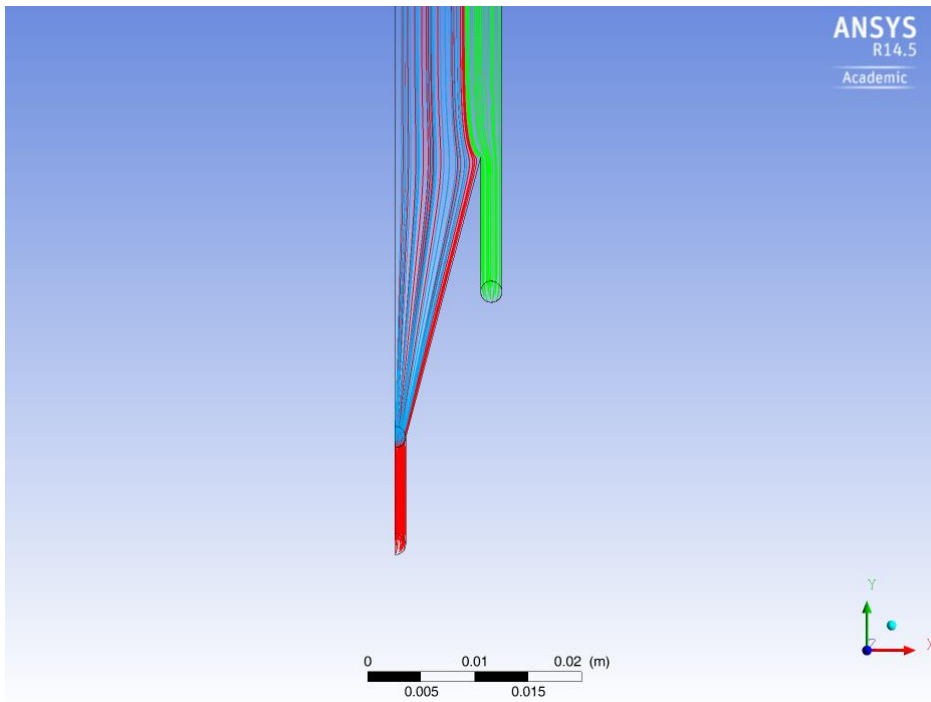


Figura 3.4.25. Linee di flusso del modulo di velocità. In rosso sono evidenziate le linee di flusso del fluido del canale principale, in azzurro quelle del fluido del canale di focusing verticale e in verde quelle del fluido del canale di focusing laterale.

Il grafico dimostra che le due portate di focusing agiscono in modo sinergico nell'indirizzare il campione verso la zona inferiore e centrale del dispositivo.

3.5 Conclusioni e sviluppi futuri

Le analisi computazionali svolte hanno portato alla progettazione preliminare di un dispositivo microfluidico che soddisfa le specifiche di progetto assegnate. Inizialmente ci si è concentrati sulla ricerca di un modo per creare un flusso omogeneo all'interno del dispositivo che permettesse di avere un comportamento simile delle particelle in tutta la zona trattata con l'aptamero. A tale scopo dopo aver scartato delle possibili geometrie considerate inizialmente si sono andate a confrontare le performance di due dispositivi con geometria simile ma, con angolo di raccordo di 15° e 30°: l'angolo di raccordo di 15° consente di avere una migliore omogeneità del flusso e pertanto è stato scelto tra i due. Ottenuto il primo obiettivo, ci si è concentrati sulla ricerca del modo migliore per concentrare le particelle nella zona adesiva del dispositivo, evitando possibili zone di ristagno. Per fare ciò si sono andate a confrontare diverse tecniche di focusing laterale ed è emerso che il canale di focusing laterale parallelo all'asse y e posto alla fine del divergente di ingresso è la scelta migliore per omogeneità del flusso e facilità di fabbricazione. L'analisi in Comsol conferma l'efficacia del

focusing nel concentrare le particelle nella zona centrale del dispositivo, evitando le zone di ristagno.

Per costringere le cellule del campione verso la base del dispositivo in modo da aumentare la possibilità di interazione tra le cellule e l'aptamero viene scelta la tecnica di focusing verticale ritenuta più idonea sulla base delle specifiche di progetto. Tra le tre possibilità analizzate viene scelta quella che consiste in un canale verticale di focusing che dista 5 mm dall'inizio divergente. Nel caso di canale di focusing posto all'inizio del divergente, infatti, non ci sono streamline del fluido di focusing vicino alla parete, mentre nel caso di canale di focusing posto a monte questo fenomeno risulta meno marcato e il flusso più omogeneo. Dovendo scegliere tra il canale che si innesta 5 mm a monte del divergente e quello a 10 mm dal divergente, la scelta ricade sul primo poiché, a fronte di performance di omogeneità del flusso uguali arretrare ulteriormente il divergente potrebbe causare una troppo elevata sedimentazione del campione nella prima parte del dispositivo. La geometria finale del dispositivo progettato è caratterizzata quindi da un angolo di raccordo di 15° , un canale di focusing laterale inserito parallelamente al flusso e un canale di focusing verticale inserito a 5 mm di distanza dall'inizio del divergente. Essa permette di concentrare efficacemente la sospensione cellulare nella zona target ricoperta dall'aptamero e aumentarne l'interazione con lo stesso.

Le analisi effettuate avvalendosi degli strumenti computazionali a disposizione sono state progettate con l'intento di evidenziare l'influenza che vari parametri (portata dei fluidi, caratteristiche del campione) hanno sulla dinamica di funzionamento del dispositivo.

Un problema riscontrato durante la progettazione del dispositivo è stato l'impossibilità di simulare l'intera geometria con il software Comsol a causa dell'eccessivo costo computazionale richiesto dalle simulazioni, non supportabile dall'hardware a disposizione. Future simulazioni di tutta la geometria del dispositivo potranno fornire dati più approfonditi, in particolare sulla traiettoria della componente cellulare e sulla sua sedimentazione.

Con la geometria progettata la simulazione della componente cellulare mostra che parte del campione sedimenta prima della zona target. Per fare in modo che questo avvenga in modo meno consistente si potrebbe considerare un cambiamento della portata di ingresso del campione cellulare associato eventualmente a una diminuzione della portata di focusing verticale.

Per rendere le simulazioni fluidodinamiche ancora più verosimili si dovrebbe inserire un parametro di viscosità del campione cellulare sperimentalmente misurato.

Infine la futura realizzazione di prototipi sperimentali del dispositivo permetterà di validare la fluidodinamica simulata computazionalmente e di effettuare eventuali modifiche dettate dalla realtà fluidodinamica nel caso fosse necessario.

Capitolo 4

Conclusioni e sviluppi futuri

Questo elaborato di tesi si pone come obiettivo quello di svolgere i primi passi nella progettazione di un dispositivo microfluidico che sia in grado di selezionare e isolare cellule staminali mesenchimali presenti in campioni di midollo osseo. Poiché date le caratteristiche proprie del campione questo non può per la sua natura essere direttamente inserito nel dispositivo, è sorta la necessità di pretrattare il campione prima del suo inserimento. A tal fine si è svolto un lavoro sperimentale di caratterizzazione del campione e di confronto tra due possibili protocolli di trattamento alternativi (Lisi e Filtrato) a quello attualmente utilizzato in laboratorio (Standard).

Dal lavoro di caratterizzazione sperimentale di campioni di midollo osseo proveniente da operazioni chirurgiche di impianto di protesi d'anca presso l'Istituto Ortopedico Galeazzi di Milano non è emersa una differenza statisticamente significativa nell'uso di tre protocolli di trattamento del campione che potrebbe alterare le sue caratteristiche in termini di resa, colonialità e differenziamento.

Questo risultato permette di poter scegliere il protocollo che rende il campione più adatto al suo inserimento nel dispositivo. Tenendo conto del fatto che i dispositivi microfluidici hanno dimensioni inferiori al millimetro in altezza, il protocollo Filtrato, poiché elimina solo le componenti del campione maggiori di $100\mu\text{m}$, potrebbe non essere sufficientemente adeguato a pretrattare il campione, così come il protocollo Standard. Il protocollo di Lisi, pur necessitando di tempistiche maggiori, permette di ottenere campioni più omogenei e qualitativamente meno viscosi. Inoltre questo protocollo presenta il vantaggio di eliminare i globuli rossi dal campione consentendo una prima selezione. Pertanto il protocollo di lisi sembra essere il più adatto tra i tre protocolli.

Passando alla fase di progettazione della microcamera di adesione, la geometria del dispositivo ideata permette di concentrare efficacemente la sospensione cellulare nella zona target ricoperta dall'aptamero e aumentarne l'interazione con lo stesso attraverso le tecniche del focusing orizzontale e verticale e il design del dispositivo. Una futura realizzazione di prototipi sperimentali del dispositivo permetterà di validare la fluidodinamica simulata computazionalmente e di effettuare eventuali modifiche dettate dalla realtà fluidodinamica nel caso fosse necessario.

Nelle simulazioni computazionali condotte si è tenuto conto di avere una soluzione con densità di particelle di 10^5 cells/mL, dato presente in letteratura e considerato adeguato per dispositivi simili. [Hatch et al.,2012] [Karnik et al.,2008] [Lahann et al.,2003] [Plouffe et al.,2009] [Vickers et al.,2012] I dati sperimentali dicono che la media della densità cellulare dei campioni presi in esame è nell'ordine di 10^6 cells/mL per il protocollo di lisi. Pertanto il campione dovrebbe essere diluito dieci volte dopo aver seguito il protocollo e il volume finale da processare aumenterebbe a 50 mL. Considerando tale volume e una portata di $1.85 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$ per l'inlet contenente le cellule, nel dispositivo finale compreso di focusing laterale e verticale si impiegherebbero 7.5 ore di tempo per

processare il campione. Nel caso fosse necessario diminuire i tempi del processo si potrebbe aumentare la portata aumentando la velocità della soluzione contenente il campione cellulare all'ingresso. Tale aumento di portata potrebbe influire positivamente diminuendo la sedimentazione cellulare nella zona pre-target del dispositivo, problema evidenziato dalle simulazioni computazionali svolte.

Un parametro che non è stato approfondito in tale elaborato è la misura della viscosità del campione di midollo osseo e della sospensione che verrà in seguito al protocollo seguito inserita nel dispositivo. In letteratura sono presenti articoli che studiano e misurano la viscosità apparente del midollo osseo, come se esso fosse un fluido omogeneo, con vari metodi: viscosimetro a piatto-cono [Bryant et al.,1989], reometro a piatti paralleli [Gurkan et al.,2007], viscosimetro a cilindri coassiali [Davis et al.,2006] e viscosimetro a caduta di sfera [Eguchi et al.,2008]. I primi due metodi possono essere applicati anche alle sospensioni cellulari, come mostrano studi in letteratura [Jordan et al.,2008] [Lichtman et al.,1973]. La misura sperimentale della viscosità della sospensione cellulare del campione permetterebbe di inserire tale parametro nelle simulazioni fluidodinamiche per renderle ancora più aderenti all'applicazione sperimentale.

Un ulteriore sviluppo futuro potrebbe essere quello di aggiungere tra la fase di pretrattamento del campione e la fase di inserimento nel dispositivo microfluidico progettato, una parte che effettui una preselezione del campione con una tecnica di size sorting per purificare ulteriormente il campione da componenti cellulari, quali ad esempio i globuli rossi residui, che per dimensione sicuramente non appartengono al target che si vuole selezionare.

Appendice

1 Standard Operating Procedure for Complete Medium for BMSCs

CHEMICALS AND REAGENTS :

500ml α -MEM : Low Glucose, contains Non-Essential AminoAcid (NEAA), L-Glutamine, Sodium Pyruvate. (GIBCO Product number: 22571; Bottle of 500 ml stored at +4°C)

Pen Strep (100X): (GIBCO Product number 15140; bottle of 100 ml stored at +4°C)

50ml Fetal bovine serum (FBS): 50ml tubes stored by freezer(-20°C-60L) (LONZA Product number: DE 14-801F Bottle of 500 ml stored at -80°C/-20°C)

HEPES (1M): biological buffer, bottle of 100ml stored by fridge (+4°C-60L) (GIBCO Product number: 15630-056 Bottle of 100 ml stored at +4°C)

FGF-2 Working Solution (500 ng/ml): aliquot in use at +4°C (stable for 3 days after reconstitution with HSA) and aliquots of stock solution stored at -80°C (0.005 mg/ml, reconstitute in HSA according to protocol to a final concentration of 500 ng/ml)

APPARATUS, GLASSWARE AND CONSUMABLES:

Sterile pipettes and tips

Pipette controller

Micropipettes

PROCEDURE:

- Warm every reagent bottles and falcon tubes into 37°C bath.
- From the 500ml bottle α -MEM take 50 ml α -MEM and put it into a 50 ml falcon tube. Mark date and contents (α -MEM) on these tubes.
- To prepare 500 ml of CM for BMSCs mix:
 - 450 ml α -MEM
 - 50 ml FBS
 - 5 ml PS
 - 5 ml HEPES
- Mark the bottle with: CM for BMSCs, date and own name.
- Put the C.M. bottle into the fridge, store +4°C.

This medium is stable for approximately **one month**. The medium contain a pH indicator, the color of the medium will change by contamination or pH variation.

Have in mind: mix very well CM solution every time you put a new reagent!

At the moment of use, add growth factors to a final concentration of **5 ng/ml FGF-2** (e.g to prepare 100 ml of CM with growth factors add 1ml FGF-2)

2 Standard Operating Procedure for Colony Forming Units-Fibroblasts Assay

CHEMICALS AND REAGENTS:

PBS (SIGMA Product number: D8537; Bottle of 500 ml stored at +4°C)

Complete Medium with 20% FBS (D-MEM supplemented with 20% FBS, 1% HEPES, 1% Sodium Piruvate and 1% PSG; see corresponding protocol for preparation)

Formalin 4% (stored at rt under chemical hood)

Crystal Violet solution (SIGMA Product number: HT901-F8OZ; bottle at rt under chemical hood)
ddH₂O

APPARATUS, GLASSWARE AND CONSUMABLES:

Micropipettes

Sterile eppendorf

Disposable pipettes and pipette controller

6 well multiplate

CELL SEEDING PROCEDURE:

- Prepare 1 ml of a cellular suspension (in complete medium) containing 1×10^5 cells/ml (suspension A)
- Take 100 μ l from suspension A and add to 900 μ l of complete medium in order to obtain 1 ml of a cellular suspension containing 1×10^4 cells/ml (suspension B)
- Take 100 μ l from suspension B and add to 900 μ l of complete medium in order to obtain 1 ml of a cellular suspension containing 1×10^3 cells/ml (suspension C)
- Add 2 ml of complete medium with 20% FBS in each well of a 6 wells multiplate
- Plate cells from the suspension C (1×10^3 cells/ml) according to the following table:

1 cell/cm ² (9.6 cells) 9,6 µl	3 cell/cm ² (28.8 cells) 28,8 µl	6 cell/cm ² (57.6 cells) 57,6 µl
12 cell/cm ² (115.2 cells) 115,2 µl	24 cell/cm ² (230.4 cells) 230,4 µl	48 cell/cm ² (460.8 cells) 460,8 µl

- Maintain cells in culture for 10-14 days at 37°C (5% CO₂)

CFU-F STAINING PROCEDURE:

- After 10 days of culture, remove medium and wash wells with PBS
- Fix cells incubating for 10 minutes with formalin 4%
- Filter Crystal Violet solution with a cell strainer in order to remove precipitates
- After incubation, remove formalin and add to each well about 1 ml of Crystal Violet solution (always check that the wells are completely covered with staining solution)
- Incubate 10 minutes at rt
- After incubation remove Crystal Violet and wash at least 5-6 times with ddH₂O
- Let dry
- Once the wells are completely dried take some photos and count the Colony Forming Units (a group of cells must contain at least 20 cells to be considered as a colony)

3 Standard Operating Procedure Osteogenic Medium

CHEMICALS AND REAGENTS:

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM): with 4500 mg/L D-Glucose, Non Essential Amino Acid (NEAA) without L-Glutamine, Sodium Pyruvate. Bottle of 500 ml stored by fridge (+4°C-600L) (GIBCO Product number: 10938-025 Bottle of 500 ml)

Fetal bovine serum (FBS): aliquots of 25 ml, stored by freezer in the cell culture room (-20°C-300L).(LONZA Product number: DE 14-801F Bottle of 500 ml stored by -80°C)

HEPES (1M): biological buffer, bottle of 100ml stored by fridge in the cell culture room (+4°C-300L) (GIBCO Product number: 15630-056 Bottle of 100 ml stored by fridge +4°C-600L)

Sodium pyruvate solution: carbohydrate source, bottle of 100ml stored by fridge in the cell culture room (+4°C-300L) (GIBCO Product number: 11360-039 Bottle of 100 ml stored by fridge +4°C-600L)

PSG (100X): aliquots of 5ml, falcon 15ml tube stored by freezer in the cell culture room (-20°C-300L) 200 mM L-Glutamine, 10.000 U penicillin, 10mg streptomycin in 0,9% NaCl (GIBCO Product number: 10378-016 Bottle of 100 ml stored by -20°C-600L)

Ascorbic Acid-2P (15 mM – 100X): Aliquots of 1ml stored by freezer in the cell culture room (-20°C-60L) (Sigma product number: A8960 - 5g stored by fridge +4°C-1500L)

β-glycerophosphate (1 M – 100X) : Aliquots of 1ml stored by freezer in the cell culture room (-20°C-300L) (Sigma product number: G9891 - 25g stored at rt in the cell culture room)

Cholecalciferol (10 μM – 1000X): Aliquots of 1ml stored by freezer in the cell culture room (-20°C-300L) (also named VitD3 - Sigma product number: C9756 - 1g stored by fridge +4°C)

Dexametasone (100 μM – 10000X) : Aliquots of 1ml stored by freezer in the cell culture room (-20°C-300L) (Sigma product number: D2915 – 100mg stored by fridge +4°C-1500L)

APPARATUS, GLASSWARE AND CONSUMABLES:

Sterile 50 ml tubes

Sterile pipettes

Pipette controller

Sterile 1.5 ml eppendorf tubes

Syringes and sterile syringe filters

Micropipettes

PROCEDURE:

OSTEOGENIC MEDIUM PREPARATION:

To prepare **50 ml** of **OSTEOGENIC MEDIUM** containing: **10% FBS, 1% HEPES, 1% PSG, 1% Sodium Pyruvate, 0.15 mM Ascorbic Acid-2P, 10 mM β-glicerophosphate, 10 nM Cholecalciferol, 0.01 μM Dexamethasone.**

First of all put every reagent bottles and falcon tubes into 37°C bath.

(Note: if, after defrosting procedure, some solid particles are into PSG aliquot shake the tube with tube shaker till all become liquid.)

After Defrosting/heating, transfer all containers into the class II hood. Be careful to operate in sterility condition at all times.

Mix all the components as follows:

- 42.5 ml D-MEM
- 5 ml FBS
- 0.5 ml HEPES
- 0.5 ml Sodium Pyruvate
- 0.5 ml PSG
- 0.5 ml Ascorbic Acid-2P (stock: 15 mM - final concentration: 0.15 mM)
- 0.5 ml β -glycerophosphate (stock: 1M - final concentration: 10 mM)
- 50 μ l Cholecalciferol (stock: 10 μ M - final concentration: 10 nM)
- 5 μ l Dexhametasone (stock: 100 μ M - final concentration: 0.01 μ M)

Note: Beware to change pipette when the solution used is changed and beware to mix well the medium after every substance is added to the DMEM.

Mark the tube with: OSTEOGENIC MEDIUM, date and own name.

Put the tube into the fridge, store +4°C.

This medium is stable for approximately **two-three weeks**.

The medium contains a pH indicator and the color of the medium will change by contamination or pH variation.

DIFFERENTIATION FACTORS PREPARATION:

L-Ascorbic Acid-2P (Sigma product number: A8960 - 5g)

Stock concentration: **15 mM** - 100X respect to the final concentration in the medium (0.15 mM)

MW: 289.54 g/mol

Weight 43.4 mg and dissolve in 10 ml H₂O MilliQ.

Filter the solution, aliquotate in 1.5 ml sterile eppendorf (1 ml/each eppendorf) and store at -20°C .

β -glycerophosphate (Sigma product number: G9891 - 25g)

Stock concentration: **1 M** - 100X respect to the final concentration in the medium (10 mM)

MW: 216.04 g/mol

Weigh 2.2 g and dissolve in 10 ml H_2O MilliQ.

Filter the solution, aliquotate in 1.5 ml sterile eppendorf (1 ml/each eppendorf) and store at -20°C .

Cholecalciferol (also named Vitamin D3 - Sigma product number: C9756 - 1g)

Stock concentration (**B**): **10 μM** - 1000X respect to the final concentration in the medium (0.01 μM)

MW: 384.64 g/mol

First prepare a stock solution (**A**) in absolute EtOH with a concentration of **10 mM**.

Weigh 3.84 mg and dissolve in 1 ml absolute EtOH (STOCK 10 mM – stored at -20°C).

From this stock solution (**A**) prepare a solution of Cholecalciferol 10 μM (**B**): take 10 μl of Cholecalciferol 10 mM (**A**) and add 9.99 ml of H_2O MilliQ.

Filter the solution, aliquotate in 1.5 ml sterile eppendorf (1 ml/each eppendorf) and store at -20°C .

ATTENTION: for the medium preparation use the stock solution B (Cholecalciferol 10 μM) – never use the stock solution A (Cholecalciferol 10 mM), this is just an intermediate dilution.

Dexamethasone (Sigma product number: D2915 – 100mg)

NOTE: The concentration of Dex contained in the powder changes depending on the product lot. Always check this concentration before preparing Dex stock solution.

Stock concentration (**B**): **100 μM** - 10000X respect to the final concentration in the medium (0.01 μM)

MW: 392.46 g/mol – The concentration of Dex in the lot in use at the moment is 59 mg/g.

$3.9246 \text{ mg} : x \text{ mg} = 59 \text{ mg} : 1000 \text{ mg} \rightarrow x = 66.51 \text{ mg}$

First prepare a stock solution (**A**) in absolute EtOH with a concentration of **10 mM**.

Weigh 66.51 mg and dissolve in 1 ml absolute EtOH (STOCK 10 mM – stored at -20°C).

From this stock solution (**A**) prepare a solution of Dexamethasone 100 μM (**B**): take 100 μl of Dexamethasone 10 mM (**A**) and add 9.9 ml of H_2O MilliQ.

Filter the solution, aliquotate in 1.5 ml sterile eppendorf (1 ml/each eppendorf) and store at -20°C .

ATTENTION: for the medium preparation use the stock solution B (Dexamethasone 100 μM) – never use the stock solution A (Dexamethasone 10 mM), this is just an intermediate dilution.

4 Standard Operating Procedure Alizarin Red-S staining and CPC extraction

CHEMICALS AND REAGENTS:

PBS (SIGMA Product number: D8537; Bottle of 500 ml stored at +4°C)

Ice-cold EtOH 70% (stored at -20°C)

Alizarin Red-S (SIGMA Product number: A5533; 25g stored at +4°C)

Na₂HPO₄ (SIGMA Product number: S7907; 500g at RT)

NaH₂PO₄ (SIGMA Product number: S8282; 500g at RT)

CPC (SIGMA Product number: C0732 100g stored at RT)

APPARATUS, GLASSWARE AND CONSUMABLES:

Micropipettes

Disposable pipettes

96 well multiplate

Multiplate reader with filter at 570 nm

PROCEDURE:

PREPARATION OF SOLUTIONS:

A. *Alizarin Red-S solution 40 mM:*

Dissolve 1.37 g of AR-S in 100 ml of ddH₂O

Adjust pH to 4.1-4.2 with NaOH 10%

Store by fridge at +4°C and keep it away from light

B. Phosphate Buffer 0.1 M:

Prepare 100 ml of Na₂HPO₄ 1M and 100 ml of NaH₂PO₄ 1M

Mix 57.7 ml of Na₂HPO₄ 1M and 42.3 ml of NaH₂PO₄ 1M

Verify that the pH of the solution is 7.0

Keep at room temperature. Don't store at 4°C because otherwise it precipitates

C. Cetylpyridinium Chloride 10% (W/V) – CPC 10%:

Take 1 ml of Phosphate Buffer 0.1 M and add ddH₂O to a final volume of 10 ml (obtaining 10 ml of Phosphate Buffer 0.01M)

Dissolve 1 g of CPC in 10 ml of Phosphate Buffer 0.01M

PROCEDURE:

- ✓ Wash twice each well with PBS
- ✓ Fix cells with ice-cold EtOH 70% for 1 hour at RT
- ✓ After the incubation remove EtOH and let dry
- ✓ Wash with ddH₂O
- ✓ Add AR-S 40 mM (see table for volumes → always check that the entire well is covered with AR-S solution) and incubate for 15 minutes at RT
- ✓ After the incubation remove AR-S solution and wash the wells with ddH₂O in order to remove the excess of staining
- ✓ Wash quickly with PBS in order to reduce the unspecific staining
- ✓ Remove PBS and let dry
- ✓ Once the wells are completely dried take some photos and then proceed with the unstaining
- ✓ Incubate each well for 15-30 minutes (until the unstaining is complete) with CPC 10% in agitation in order to extract AR-S (see table below for CPC volumes)
- ✓ Transfer the extracted solution in a MW96 and read absorbance at 570 nm (read at least 100 µl of sample and remember to maintain the same reading volume among different experiment to compare data).

	MW6	MW12	MW24
Surface	10 cm ²	4 cm ²	2 cm ²
AR-S Volume	1 ml	400 µl	200 µl
CPC Volume	1,5 ml	600 µl	300 µl

5 Standard Operating Procedure Adipogenic Medium

CHEMICALS AND REAGENTS:

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM): with 4500 mg/L D-Glucose, Non Essential Amino Acid (NEAA) without L-Glutamine, Sodium Pyruvate. Bottle of 500 ml stored by fridge (+4°C-600L)(GIBCO Product number: 10938-025 Bottle of 500 ml)

Fetal bovine serum (FBS): aliquots of 25 ml, stored by freezer in the cell culture room (-20°C-300L)(LONZA Product number: DE 14-801F Bottle of 500 ml stored by -80°C)

HEPES (1M): biological buffer, bottle of 100ml stored by fridge in the cell culture room (+4°C-300L) (GIBCO Product number: 15630-056 Bottle of 100 ml stored by fridge +4°C-600L)

Sodium pyruvate solution: carbohydrate source, bottle of 100ml stored by fridge in the cell culture room (+4°C-300L)(GIBCO Product number: 11360-039 Bottle of 100 ml stored by fridge +4°C-600L)

PSG (100X): aliquots of 5ml, falcon 15ml tube stored by freezer in the cell culture room (-20°C-300L) 200 mM L-Glutamine, 10.000 U penicillin, 10mg streptomycin in 0,9% NaCl (GIBCO Product number: 10378-016 Bottle of 100 ml stored by -20°C-600L)

Insulin (2 mg/ml – 200X)

Aliquots of 1ml stored by freezer in the cell culture room (-20°C-60L) (Sigma product number: I9278 – 10mg/ml stored by fridge +4°C-1500L)

Indomethacin (40 mM – 200X)

Aliquots of 1ml stored by freezer in the cell culture room (-20°C-300L) (Sigma product number: I7378 - 5g stored at rt in the cell culture room)

Isobutyl-1-methylxanthine - IBMX (40 mM – 80X)

Aliquots of 1ml stored by freezer in the cell culture room (-20°C-300L) (Sigma product number: I7018 – 100mg stored by -20°C-300L in the cell culture room)

Dexhametasone (100 µM – 100X)

Aliquots of 1ml stored by freezer in the cell culture room (-20°C-300L) (Sigma product number: D2915 – 100mg stored by fridge +4°C-1500L)

APPARATUS, GLASSWARE AND CONSUMABLES:

Sterile 15 ml tubes and 1.5 ml eppendorf tubes

Sterile pipettes and pipette controller

Syringes and sterile syringe filters

Micropipettes

PROCEDURE:

For adipogenic differentiation 2 different culture media must be alternatively used in order to reduce the cytotoxic effect. These media are respectively named INDUCTION and MAINTENANCE adipogenic medium.

First of all put every reagent bottles and falcon tubes into 37°C bath.

(Note: if, after defrosting procedure, some solid particles are still visible into the aliquots of PSG, Indomethacin and IBMX shake the tube with tube shaker till all become liquid.)

After Defrosting/heating, transfer all containers into the class II hood. Be careful to operate in sterility condition at all times.

INDUCTION ADIPOGENIC MEDIUM PREPARATION:

To prepare **10 ml** of **INDUCTION ADIPOGENIC MEDIUM** containing: **10% FBS, 1% HEPES, 1% PSG, 1% Sodium Pyruvate, 10 µg/ml Insulin, 200 µM Indomethacin, 500 µM IBMX, 1 µM Dexamethasone.**

Mix all the components as follows:

- 8.375 ml D-MEM
- 1 ml FBS
- 100 µl HEPES
- 100 µl Sodium Pyruvate
- 100 µl PSG
- 50 µl Insulin (stock: 2 mg/ml - final concentration: 10 µg/ml)
- 50 µl Indomethacin (stock: 40 mM - final concentration: 200 µM)
- 125 µl IBMX (stock: 40 mM - final concentration: 500 µM)
- 100 µl Dexhametasone (stock: 100 µM - final concentration: 1 µM)

MAINTENANCE ADIPOGENIC MEDIUM PREPARATION:

To prepare **10 ml** of **INDUCTION ADIPOGENIC MEDIUM** containing: **10% FBS, 1% HEPES, 1% PSG, 1% Sodium Pyruvate, 10 µg/ml Insulin.**

Mix all the components as follows:

- 8.65 ml D-MEM
- 1 ml FBS
- 100 μ l HEPES
- 100 μ l Sodium Pyruvate
- 100 μ l PSG
- 50 μ l Insulin (stock: 2 mg/ml - final concentration: 10 μ g/ml)

Note: Beware to change pipette when the solution used is changed and beware to mix well the medium after every substance is added to the DMEM.

Mark the tubes with: INDUCTION ADIPOGENIC MEDIUM and MAINTENANCE ADIPOGENIC MEDIUM, date and own name.

Put the tubes into the fridge and store +4°C.

These media are stable for approximately **two weeks**.

The medium contains a pH indicator and the color of the medium will change by contamination or pH variation.

DIFFERENTIATION FACTORS PREPARATION:

Insulin (Sigma product number: I9278 – 10 mg/ml – 5 ml) Stock concentration: **2 mg/ml** - 200X respect to the final concentration in the medium (10 μ g/ml) Take 1 ml from Insulin 10 mg/ml and add 4 ml of sterile PBS in order to obtain a stock solution with a concentration of 2 mg/ml. Aliquotate in 1.5 ml sterile eppendorf (1 ml/each eppendorf) and store at –20°C.

Indomethacin (Sigma product number: I7378 - 5g)

Stock concentration: **40 mM** - 200X respect to the final concentration in the medium (200 μ M) MW: 357.79 g/mol. Weigh 14.3 mg and dissolve into 1 ml of absolute EtOH. into a sterile eppendorf and store at –20°C.

IBMX (Sigma product number: I7018 – 100mg)

Stock concentration: **40 mM** - 80X respect to the final concentration in the medium (500 μ M)

MW: 222.24 g/mol. Weight 44.4 mg and dissolve into 5 ml of absolute EtOH. After complete dissolution, filter the solution, aliquotate in 1.5 ml sterile eppendorf (1 ml/each eppendorf) and store at –20°C.

Dexametasone (Sigma product number: D2915 – 100mg)

NOTE: The concentration of Dex contained in the powder changes depending on the product lot. Always check this concentration before preparing Dex stock solution. Stock concentration (**B**): **100 μ M** - 10000X respect to the final concentration in the medium (0.01 μ M) MW: 392.46 g/mol – The concentration of Dex in the lot in use at the moment is 59 mg/g. $3.9246 \text{ mg} : x \text{ mg} = 59 \text{ mg} : 1000 \text{ mg} \rightarrow x = 66.51 \text{ mg}$ First prepare a stock solution (**A**) in absolute EtOH with a concentration of **10 mM**. Weigh 66.51 mg and dissolve in 1 ml absolute EtOH (STOCK 10 mM – stored at -20°C). From this stock solution (A) prepare a solution of Dexhametasone 100 μ M (**B**): take 100 μ l of Dexhametasone 10 mM (A) and add 9.9 ml of H₂O MilliQ. Filter the solution, aliquotate in 1.5 ml sterile eppendorf (1 ml/each eppendorf) and store at -20°C .

ATTENTION: for the medium preparation use the stock solution B (Dexhametasone 100 μ M) – never use the stock solution A (Dexhametasone 10 mM), this is just an intermediate dilution.

6 Standard Operating Procedure Oil Red O staining and extraction

CHEMICALS AND REAGENTS:

PBS (SIGMA Product number: D8537; Bottle of 500 ml stored at $+4^{\circ}\text{C}$)

Formalin 4% (stored at RT under chemical hood)

Oil Red O (SIGMA Product number: O0625; 25g stored at $+4^{\circ}\text{C}$)

Isopropanol 100% (stored at RT under chemical hood)

Isopropanol 60% (stored at RT)

APPARATUS, GLASSWARE AND CONSUMABLES:

Micropipettes

Disposable pipettes

96 well multiplate

Multiplate reader with filter at 490 nm

PROCEDURE:

PREPARATION OF SOLUTIONS:

D. Oil Red O stock solution 8.5 mM:

Weight 0.7 g of ORO and dissolve in 200 ml of Isopropanol 100%

Let in agitation on a magnetic stirrer o.n.

Filter with a 0.22 µm filter

Store by fridge at +4°C and keep it away from light

E. Oil Red O working solution (this solution must be prepared at the moment):

To prepare 10 ml of Oil Red O working solution mix 6 ml of ORO stock solution (8.5 mM) with 4 ml of ddH₂O

Let the solution at RT for 20 minutes and filter with a 0.22 µm filter

F. Isopropanol 60%:

To prepare 50 ml of Isopropanol 60% take 30 ml of Isopropanol 100% and add 20 ml of ddH₂O

PROCEDURE:

- ✓ Wash twice each well with PBS
- ✓ Fix cells with formalin 4% for 10 minutes at RT
- ✓ Wash wells with Isopropanol 60% and let dry
- ✓ Add Oil Red O working solution (be careful not to touch the sides of the wells) and incubate at RT for 15 minutes
- ✓ After incubation remove ORO and immediately add ddH₂O
- ✓ Wash wells with ddH₂O to remove the excess of staining
- ✓ Take pictures (keep ddH₂O in the wells while taking photos)
- ✓ Remove ddH₂O and let dry before proceeding with ORO extraction
- ✓ Elute Oil Red O by adding Isopropanol 100% (see table below for volumes) and incubating about 10 min (can be longer) at RT
- ✓ Pipet the Isopropanol with Oil Red O up and down several times to solubilize all Oil Red O
- ✓ Transfer the extracted solution in a MW96 and read absorbance at 490 nm (1.0 sec; read at least 100 µl of sample and remember to maintain the same reading volume among different experiment to compare data)

	MW6	MW12	MW24
Surface	10 cm ²	4 cm ²	2 cm ²
ORO	1 ml	400 µl	200 µl
Isopropanol 100%	1,5 ml	600 µl	300 µl

7 Pre-analisi del strumento computazionale COMSOL. Validazione modulo particelle

Allo scopo di utilizzare il modulo (Particle Tracing Module) disponibile nella suite di Comsol Multiphysics 4.3, per lo studio del moto di particelle discrete inserite all'interno di un fluido, è stato necessario procedere con alcune attività mirate di messa a punto di tale strumento, procedendo con alcune simulazioni preliminari.

A tal fine è stata disegnata una geometria di un canale a sezione quadrata di dimensioni millimetriche ($800 \mu\text{m} \times 800 \mu\text{m} \times 4000 \mu\text{m}$) con al centro una colonna a sezione cilindrica (raggio = $200 \mu\text{m}$) (Figura 7.1). Su questa geometria sono state svolte ripetute simulazioni inserendo particelle in un flusso stazionario, allo scopo di analizzarne la posizione al variare di alcune caratteristiche delle stesse (diametro e densità delle particelle), di alcuni parametri che caratterizzano il flusso (velocità massima di ingresso del fluido, viscosità del fluido) e di parametri propri della simulazione numerica (time step size).

Per quanto riguarda le condizioni di bordo della simulazione:

- 1) Ingresso: profilo di velocità parabolico.
- 2) Pareti laterali: si sono impostate le condizioni di simmetria.
- 3) Parete superiore e inferiore e parete della colonna: condizione di non scivolamento per il fluido e di stick (attaccamento) per le particelle.
- 4) Uscita: pressione nulla.

La simulazione del flusso in regime stazionario e quella riguardante il moto delle particelle (non stazionario) vengono svolte in successione: la presenza di particelle non ha quindi influenza sul moto del fluido.

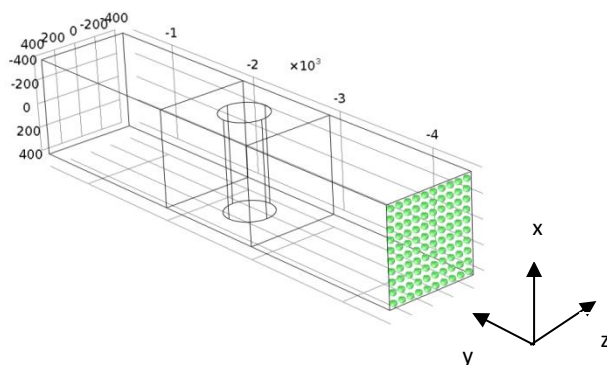


Figura 7.1 Immagine del dispositivo con le particelle inserite all'ingresso nell'istante $t=0s$.

I parametri del caso base di simulazione, preso come riferimento sono riportati nella seguente tabella:

Densità del fluido	1000 Kg/m ³
Viscosità del fluido	0.00076 Pa·s
Velocità massima all'inlet	150 µm/s
Diametro delle particelle	10 µm
Densità delle particelle	1000 Kg/m ³
Numero di particelle	100
Time Step Size	0.05 s

Tabella 7.1 Parametri del caso base di simulazione.

I valori scelti per le proprietà del fluido corrispondono a quelli dell'acqua a 37°C, il diametro e la densità delle particelle corrispondono a quelli delle cellule mononucleate. Gli altri parametri hanno valori ipotizzati sulla base del presunto funzionamento del chip.

La mesh realizzata è composta da elementi tetraedrici. Test di sensitività sono stati svolti con quattro varianti della medesima griglia, variando la dimensione degli elementi nel canale o sulla parete della colonna.

Mesh	1	2	3	4
Numero di elementi	408618	567541	673748	841613

Tabella 7.2 Numero di elementi delle quattro mesh realizzate.

Si sono confrontati i valori e i grafici di shear rate su diverse linee del dispositivo e sulla circonferenza della colonna. Dai risultati emerge che la differenza massima di valori di shear rate sulla linea posta al centro del canale in direzione y è dello 0.2% tra la mesh 2 e la mesh 4.

Nella tabella seguente vengono riportate le differenze massime della posizione delle particelle al variare della mesh usata al tempo 15s.

Confronto:	Max differenza x [%]	Max differenza y [%]	Max differenza z [%]
Mesh1-mesh3	0.0108	0.0203	0.0023
Mesh1-mesh2	0.0107	0.0160	0.0018
Mesh1-mesh4	0.0097	0.0172	0.0030

Tabella 7.3 Confronto tra le diverse mesh delle differenze massime percentuali del valore delle coordinate delle particelle.

Come mostrato in tabella la differenza percentuale è trascurabile, perciò sarà possibile usare la mesh più lasca (mesh 1) nelle future simulazioni senza che i risultati siano mesh dipendenti. Non si è valutata una mesh ancora meno fitta perché la posizione e il numero delle particelle inseribili nella simulazione sono legati alla dimensione degli elementi mesh.

In seguito si riportano i dati e le osservazioni effettuate sulle simulazioni al variare dei singoli parametri.

Particelle

Solo le particelle che hanno una traiettoria esattamente perpendicolare alla superficie laterale del cilindro, vengono catturate dalla condizione di stick imposta su di essa. La disposizione delle particelle all'ingresso influenza pertanto il numero di particelle che si attaccherà alla colonna. Un numero dispari o il quadrato di un numero dispari di particelle garantisce che esse siano presenti sulla linea verticale centrale, che è l'unica a garantire analiticamente la condizione di cui sopra.

Range (Time step size)

Simulazioni effettuate con range di valore 0.001s ,0.05s e 0.1s non danno differenze rilevanti sulla posizione delle particelle, poiché il modulo di Particle Tracing si identifica come “post processing” e non come ulteriore simulazione numerica.

Diametro delle particelle

Vengono condotte simulazioni in assenza di gravità con particelle di diametro 10μm, 50μm e 80μm. Si rilevano differenze maggiori nella posizione delle particelle laddove è maggiore la differenza di diametro. Tali differenze sono inferiori al micrometro in tutte le direzioni e quindi irrilevanti rispetto al diametro della particella.

Gravità e densità delle particelle

La formulazione della forza di gravità che il programma permette di inserire nella simulazione è la seguente :

$$F = \frac{m_p * g * (\rho_p - \rho_f)}{\rho_p}$$

dove m_p e ρ_p sono la massa e la densità della particella, g l'accelerazione di gravità e ρ_f è la densità del fluido.

Questa forza crea un contributo aggiuntivo all'accelerazione della particella in direzione verticale. In assenza di altra azione del flusso sulle particelle al di fuori di quella laminare e unidirezionale impostata in ingresso, la traiettoria delle particelle corrisponde a quella calcolata in modo analitico nel caso di profilo parabolico seguendo le indicazioni dell'articolo [Huh et al.,2007]. In figura 7.2 viene mostrato il confronto tra la traiettoria di una particella calcolata analiticamente e quella fornita da COMSOL a parità di condizioni iniziali.

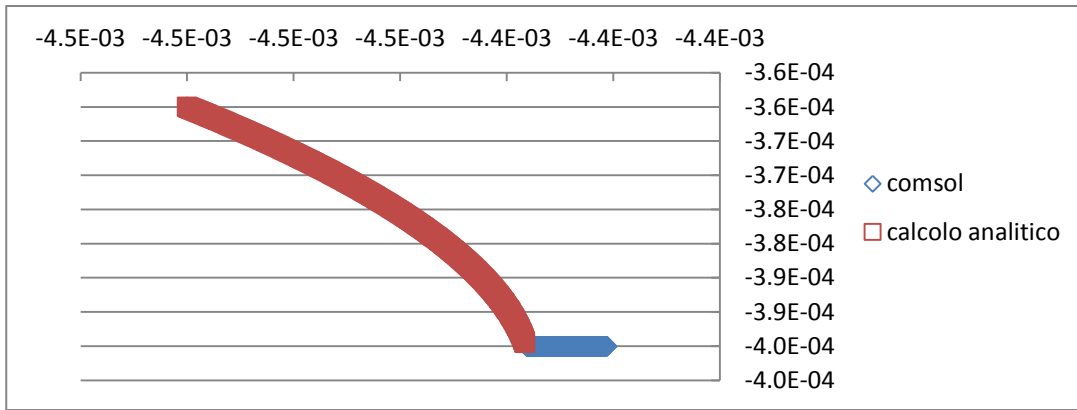


Figura 7.2 Confronto tra la traiettoria calcolata analiticamente e quella fornita dal software.

Al variare della densità del “materiale” che compone le particelle, è stata valutata la percentuale di particelle che hanno raggiunto il fondo dopo 60s.

In tabella 7.4 vengono mostrati i valori di densità delle particelle utilizzati.

Densità

1050 kg/m³

1100 kg/m³ (+10%)

1300 kg/m³ (+30%)

1500 kg/m³ (+50%)

Tabella 7.4 Valori di densità delle particelle.

La densità cellulare è intorno a 1050 kg/m³; gli altri valori sono di prova, per valutare il comportamento del modulo. In figura 7.3 viene mostrata la posizione delle particelle nel canale al variare della densità [Kg/m³].

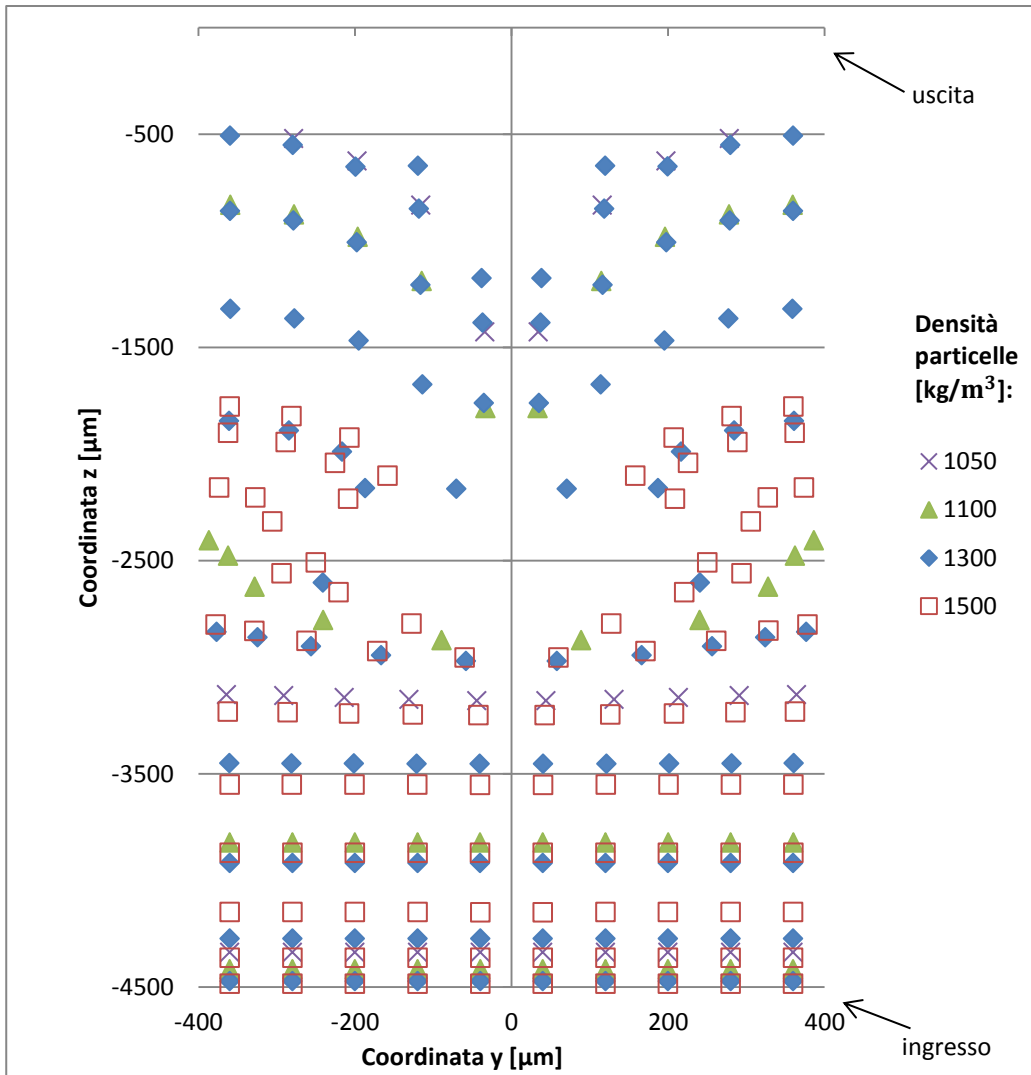


Figura 7.3 Immagine del canale dall'alto (piano yz) a t=20s. Le particelle con densità più elevata sedimentano a una coordinata z più vicina all'ingresso.

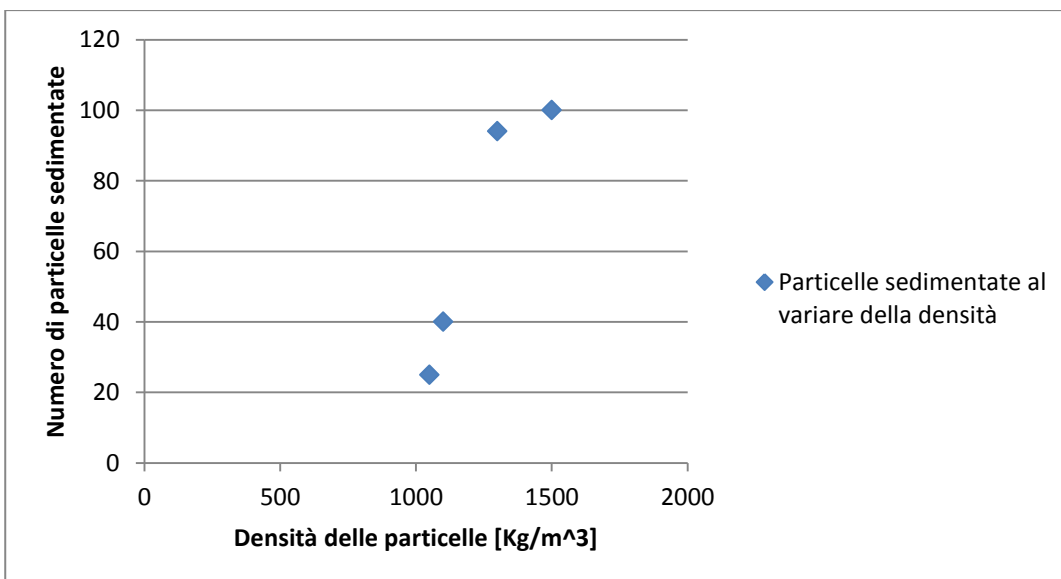


Figura 7.4 Numero di particelle sedimentate al variare della densità delle particelle.

Come è possibile notare da figura 7.3 le particelle con densità maggiore risentono di una forza di gravità più elevata e cadono prima lungo il canale. L'andamento delle particelle che si attaccano alla base del canale all'aumentare della densità segue un trend quasi lineare come mostrato in figura 7.4. Aumentando la densità delle particelle oltre il valore di 1300 Kg/m^3 tutte le 100 particelle inserite cadono. Per questo motivo l'ultimo dato si discosta dall'andamento lineare dei risultati.

Velocità

Vengono condotte simulazioni con velocità massima del profilo parabolico in ingresso di: $150 \mu\text{m/s}$, $225 \mu\text{m/s}$ (+50%), $1500 \mu\text{m/s}$ e $15000 \mu\text{m/s}$.

Si confrontano le coordinate delle particelle ai tempi di 15s per il caso base, 10s per $225 \mu\text{m/s}$, 1.5s per $1500 \mu\text{m/s}$ e 0.15s per $15000 \mu\text{m/s}$, infatti se i rapporti in velocità vengono rispettati ci si trova nella stessa posizione lungo il canale. Si nota un cambiamento rilevante nella posizione delle particelle nel confronto tra i profili con velocità massima di $150 \mu\text{m/s}$ e $15000 \mu\text{m/s}$. Inoltre le traiettorie delle particelle passano più vicine alla colonna nel caso con velocità massima più bassa mentre si allontanano all'aumentare della velocità come mostra il grafico Matlab in figura 7.5.

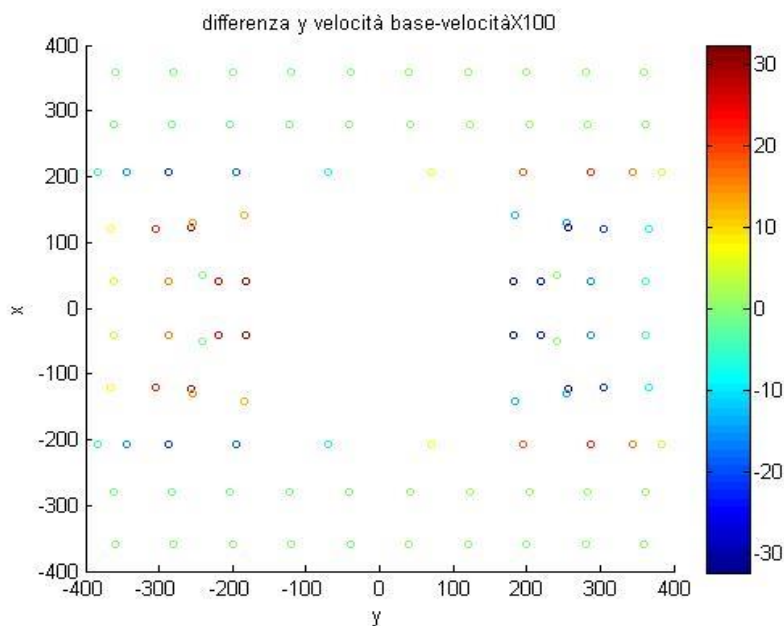


Figura 7.5 Grafico matlab sulla differenza tra la coordinata y delle particelle nel caso con velocità base ($150 \mu\text{m/s}$) e la coordinata y delle particelle nel caso con velocità $15000 \mu\text{m/s}$. Il grafico riporta una sezione xy del canale in prossimità della colonna; se si considerano le particelle che si trovano a coordinata y positiva il colore blu indica che la differenza tra la coordinata y delle particelle nel caso base e quella nel caso con velocità aumentata è negativa, per cui nel caso con velocità maggiore la coordinata y delle particelle risulta più elevata, quindi esse passano più lontane della colonna (la colonna si trova al centro del canale). La stessa situazione speculare si verifica per la parte della sezione a y negativa.

Viscosità del fluido

Si effettuano simulazioni variando la viscosità del fluido da $0.00076 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (valore base) a $0.000076 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, $0.0076 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, $0.076 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ e $0.76 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Rispetto al caso base aumentando la viscosità del fluido le differenze massime riscontrate sulla posizione delle particelle non superano gli $1.18 \mu\text{m}$, mentre

il confronto tra il caso base e il caso con viscosità 10 volte inferiore presenta valori massimi della differenza di posizione delle particelle superiori a 15.3 μm . Questo comportamento può essere spiegato dal fatto che aumentando la viscosità il Reynolds diminuisce ma il flusso rimane comunque di Stokes (Reynolds <1) mentre nell'ultimo caso l'aumento del numero di Reynolds di 10 volte implica che il flusso non possa essere più considerato di Stokes. Le forze viscosive pertanto non sono più dominanti rispetto alle forze convettive e ciò causa un cambiamento nella traiettoria delle particelle.

Confronto tra modello di Stokes e di Shiller-Neumann

Nel modello Particle Tracing è possibile scegliere tra il modello di Stokes e Shiller-Neumann per l'espressione della drag force. Nel modello di Stokes la drag force viene calcolata con la seguente formula: $F_d = -6\pi\mu r v$, dove μ è la viscosità del fluido, r è il raggio della particella e v è la velocità relativa tra il fluido e la particella. Questo modello è indicato nei casi con Reynolds inferiori all'unità. Nel modello di Shiller-Neumann si introduce un coefficiente di drag $C_D = 24(1 + 0.15Re_d^{0.687})/Re_d$, dove Re_d è il numero di Reynolds basato sul diametro della particella; il coefficiente di drag viene poi inserito nel calcolo della drag force: $F_d = 0.5C_D A \rho_c (u_c - u_d)|u_c - u_d|$, dove u_c è la velocità della parte continua (il fluido) e u_d è la velocità della parte dispersa (le particelle), A è la proiezione dell'area della particella nella direzione del flusso, ρ_c è la densità del fluido. A parità di Reynolds la soluzione non cambia in modo significativo (differenza massima tra le coordinate delle particelle inferiore al micron) se si usa il modello di Stokes o Shiller-Neumann.

Non viene inserito nessun modello per l'interazione particella-particella.

Impostazioni del programma per la simulazione del coating adesivo

Dopo aver valutato i parametri discussi precedentemente si è passati all'individuazione delle modalità di simulazione più appropriate che permettano di ricreare una situazione computazionale il più possibile simile alla realtà osservata sperimentalmente.

L'obiettivo è quello di riuscire a simulare nel dispositivo la presenza di zone dotate di un sensore (che nella realtà è costituito da una superficie coperta da un aptamero specifico) in cui le particelle che rappresentano le cellule target rimangono attaccate e di zone prive di sensore in cui le particelle scorrono con la velocità del fluido una volta sedimentate per gravità. Dopo l'analisi della documentazione e delle varie possibilità modellistiche offerte dal programma si sono fatte le seguenti valutazioni:

1. Il modello matematico utilizzato considera di default le particelle come dei punti e le coordinate estratte delle particelle sono quelle rappresentative del loro baricentro. Le particelle sono considerate "sedimentate" (aderite alla superficie inferiore del canale

secondo la condizione di “stick”) quando il loro baricentro raggiunge la superficie del fondo del canale. Per fare in modo che la particella aderisca al fondo in modo realistico è necessario inserire un Workplane (piano) a una distanza pari al raggio della particella dalla base inferiore del canale, e impostare su di esso una condizione di stick. In questo modo si simula il fatto che le particelle si fermano appena una parte di esse tocca il fondo del canale. Questa parte è rappresentativa delle condizioni da inserire laddove si vuole simulare la presenza del coating “adesivo”.

2. Nelle parti del canale dove non si vuole simulare la presenza di un coating, dove si presume quindi che la particella raggiunga la superficie ma non vi aderisca, è necessario inserire nella definizione della forza di gravità la condizione che essa agisca solo nella parte di canale superiore a un piano che dista dal fondo del canale di una dimensione pari al raggio della particella. In questo modo le particelle raggiungono la base del canale per gravità e successivamente avanzano con la velocità che ha il fluido a quella altezza.
3. Con COMSOL non è possibile simulare contemporaneamente particelle di diverso diametro. Per simulare la presenza di cellule target (staminali dal diametro di 10 μ m) e la presenza di altre tipologie di cellule (dal diverso diametro) si possono aggiungere numerosi Study che risolvono la fluidodinamica delle famiglie di particelle in modo indipendente. In questo modo è possibile simulare il comportamento della componente cellulare complessiva del campione.
4. Per simulare il fatto che il sensore ha un'efficienza che non è del 100% è possibile inserire nella condizione di Stick imposta sulla parete una probabilità numerica che indica la percentuale di particelle sul totale di quelle che toccando la superficie si attaccano alla base.

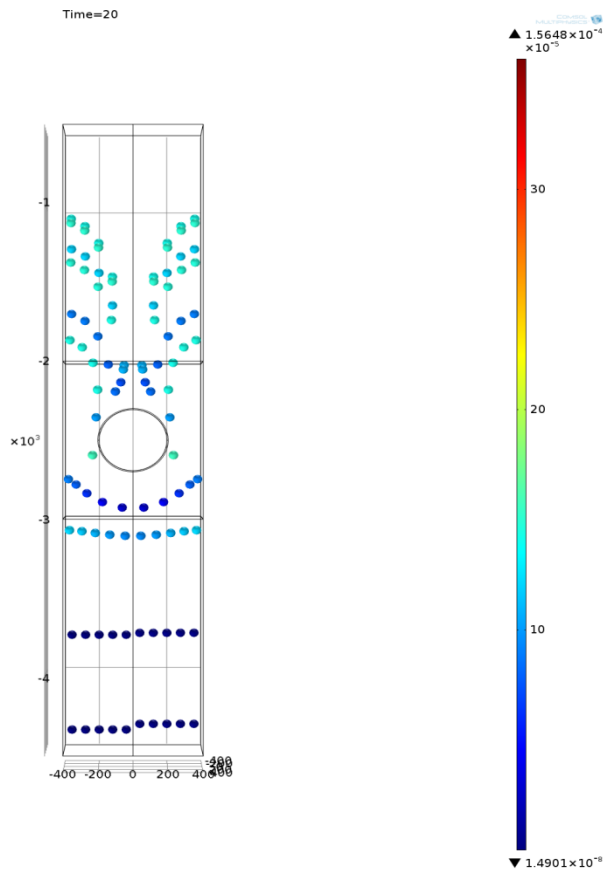


Figura 7.6 Immagine del piano yz a $t = 20s$. Nella parte a y negativa viene impostata la condizione di stick per cui le particelle quando raggiungono la base del dispositivo si fermano (simulazione del coating adesivo); nella parte di y positiva invece le particelle quando raggiungono la base rotolano con la velocità del fluido.

Bibliografia

Adams, A. A., Okagbare, P. I., Feng, J., Hupert, M. L., Patterson, D., Göttert, J., ... & Soper, S. A. (2008). Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(27), 8633-8641.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815–1822.

Andersson, H., & Van den Berg, A. (2003). Microfluidic devices for cellomics: a review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *92*(3), 315-325.

Bartholomew A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., ... & Hoffman, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology*, *30*(1), 42-48.

Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005;105:2214 –2219.

Bhagat, A. A. S., Bow, H., Hou, H. W., Tan, S. J., Han, J., & Lim, C. T. (2010). Microfluidics for cell separation. *Medical & biological engineering & computing*, *48*(10), 999-1014.

Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., & Robey, P. G. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells*, *19*(3), 180-192.

Bonfield T. L., “Cell based therapy aides in infection and inflammation in the murine model of Cystic Fibrosis and lung disease,” *Stem Cell Discovery*, vol. 3, no. 2, pp. 139–153, 2013.

Bose, S., Singh, R., Hanewich-Hollatz, M., Shen, C., Lee, C. H., Dorfman, D. M., ... & Karnik, R. (2013). Affinity flow fractionation of cells via transient interactions with asymmetric molecular patterns. *Scientific reports*, *3*.

Bryant, J. D., David, T., Gaskell, P. H., King, S., & Lond, G. (1989). Rheology of bovine bone marrow. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, *203*(2), 71-75.

- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*, 25(11), 2739-2749.
- Chang, W. C., Lee, L. P., & Liepmann, D. (2005). Biomimetic technique for adhesion-based collection and separation of cells in a microfluidic channel. *Lab on a Chip*, 5(1), 64-73.
- Choi, S., Karp, J. M., & Karnik, R. (2012). Cell sorting by deterministic cell rolling. *Lab on a Chip*, 12(8), 1427-1430.
- Christodoulides, N., Mohanty, S., Miller, C. S., Langub, M. C., Floriano, P. N., Dharshan, P., ... & McDevitt, J. T. (2005). Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab on a Chip*, 5(3), 261-269.
- Cioffi, M., Moretti, M., Manbachi, A., Chung, B. G., Khademhosseini, A., & Dubini, G. (2010). A computational and experimental study inside microfluidic systems: the role of shear stress and flow recirculation in cell docking. *Biomedical microdevices*, 12(4), 619-626.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006;107:367–372.
- Curran, J. M., Pu, F., Chen, R., & Hunt, J. A. (2011). The use of dynamic surface chemistries to control msc isolation and function. *Biomaterials*, 32(21), 4753-4760.
- Davis, B. L., & Praveen, S. S. (2006). Nonlinear versus linear behavior of calcaneal bone marrow at different shear rates. In *American Society of Biomechanics Annual Meeting, Blacksburg, VA*.
- Didar, T. F., & Tabrizian, M. (2010). Adhesion based detection, sorting and enrichment of cells in microfluidic Lab-on-Chip devices. *Lab on a Chip*, 10(22), 3043-3053.
- Di Carlo, D., Irimia, D., Tompkins, R. G., & Toner, M. (2007). Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(48), 18892-18897.
- Di Girolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., & Prockop, D. J. (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming

assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British journal of haematology*, 107(2), 275-281.

Eguchi, Y., & Karino, T. (2008). Measurement of rheologic property of blood by a falling-ball blood viscometer. *Annals of biomedical engineering*, 36(4), 545-553.

El-Ali, J., Sorger, P. K., & Jensen, K. F. (2006). Cells on chips. *Nature*, 442(7101), 403-411.

Erickson, D. (2005). Towards numerical prototyping of labs-on-chip: modeling for integrated microfluidic devices. *Microfluidics and Nanofluidics*, 1(4), 301-318.

Farini A., Sitzia, C., Erratico, S., Meregalli, M., & Torrente, Y. (2014). Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells in Chronic Diseases. *Stem cells international*, 2014.

Fiorini, G. S., & Chiu, D. T. (2005). Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. *BioTechniques*, 38(3), 429-446.

Gaver D, Kute S (1998) A theoretical model study of the influence of fluid stresses on a cell adhering to a microchannel wall. *Biophys J* 75:721–733

Glatzel, T., Litterst, C., Cupelli, C., Lindemann, T., Moosmann, C., Niekrawietz, R., ... & Koltay, P. (2008). Computational fluid dynamics (CFD) software tools for microfluidic applications—A case study. *Computers & Fluids*, 37(3), 218-235.

Gleghorn, J. P., Pratt, E. D., Denning, D., Liu, H., Bander, N. H., Tagawa, S. T., ... & Kirby, B. J. (2010). Capture of circulating tumor cells from whole blood of prostate cancer patients using geometrically enhanced differential immunocapture (GEDI) and a prostate-specific antibody. *Lab on a Chip*, 10(1), 27-29.

Granero-Molto F., J. A. Weis, M. I. Miga et al., “Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing,” *Stem Cells*, vol. 27, no. 8, pp. 1887–1898, 2009.

Guan X-J, Song L, Han F-F, Cui Z-L, Chen X, Guo X-J et al. Mesenchymal stem cells protect cigarette smoke-damaged lung and pulmonary function partly via VEGF-VEGF receptors. *J Cell Biochem* 2013; 114: 323–335.

- Gurkan, U. A., & Akkus, O. (2007, June). An implantable magnetoelastic sensor system for wireless physiological sensing of viscosity. In *ASME 2007 Summer Bioengineering Conference* (pp. 759-760). American Society of Mechanical Engineers.
- Hatch, A., Pesko, D. M., & Murthy, S. K. (2012). Tag-free microfluidic separation of cells against multiple markers. *Analytical chemistry*, *84*(10), 4618-4621.
- Hou, H. H., Tsai, C. H., Fu, L. M., & Yang, R. J. (2009). Experimental and numerical investigation into micro-flow cytometer with 3-D hydrodynamic focusing effect and micro-weir structure. *Electrophoresis*, *30*(14), 2507-2515.
- Howard, D., Seo, Y., Hahm, B., & Kwon, J. (2014). A Microfluidic Device with Concave Surfaced Micropost Array for Rare Cell Capture.
- Huang, L. R., Cox, E. C., Austin, R. H., & Sturm, J. C. (2004). Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science*, *304*(5673), 987-990.
- Huh, D., Bahng, J. H., Ling, Y., Wei, H. H., Kripfgans, O. D., Fowlkes, J. B., ... & Takayama, S. (2007). Gravity-driven microfluidic particle sorting device with hydrodynamic separation amplification. *Analytical chemistry*, *79*(4), 1369-1376.
- Hur, S. C., Mach, A. J., & Di Carlo, D. (2011). High-throughput size-based rare cell enrichment using microscale vortices. *Biomicrofluidics*, *5*(2), 022206.
- Iordan, A., Duperray, A., & Verdier, C. (2008). Fractal approach to the rheology of concentrated cell suspensions. *Physical Review E*, *77*(1), 011911.
- Jarvas, G., & Guttman, A. (2013). Modeling of cell sorting and rare cell capture with microfabricated biodevices. *Trends in biotechnology*, *31*(12), 696-703.
- Jiang XX, Zhang Y, Liu B et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005;105:4120–4126.
- Karnik, R., Hong, S., Zhang, H., Mei, Y., Anderson, D. G., Karp, J. M., & Langer, R. (2008). Nanomechanical control of cell rolling in two dimensions through surface patterning of receptors. *Nano letters*, *8*(4), 1153-1158.

Katrtsis D. G., P. A. Sotiropoulou, E. Karvouni et al., “Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium,” *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, vol. 65, no. 3, pp. 321–329, 2005

Kobayashi, J., Mori, Y., Okamoto, K., Akiyama, R., Ueno, M., Kitamori, T., & Kobayashi, S. (2004). A microfluidic device for conducting gas-liquid-solid hydrogenation reactions. *Science*, 304(5675), 1305-1308.

Koch, M. A., Vrij, E. J., Engel, E., Planell, J. A., & Lacroix, D. (2010). Perfusion cell seeding on large porous PLA/calcium phosphate composite scaffolds in a perfusion bioreactor system under varying perfusion parameters. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(4), 1011-1018.

Kuntaegowdanahalli, S. S., Bhagat, A. A. S., Kumar, G., & Papautsky, I. (2009). Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels. *Lab on a Chip*, 9(20), 2973-2980.

Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., & Robey, P. G. (2001). Circulating skeletal stem cells. *The Journal of cell biology*, 153(5), 1133-1140.

Lahann, J., Balcells, M., Lu, H., Rodon, T., Jensen, K. F., & Langer, R. (2003). Reactive polymer coatings: a first step toward surface engineering of microfluidic devices. *Analytical chemistry*, 75(9), 2117-2122.

Lee, G. B., Chang, C. C., Huang, S. B., & Yang, R. J. (2006). The hydrodynamic focusing effect inside rectangular microchannels. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16(5), 1024.

Lichtman, M. A. (1973). Rheology of Leukocytes, Leukocyte Suspensions, and Blood in Leukemia POSSIBLE RELATIONSHIP TO CLINICAL MANIFESTATIONS. *Journal of Clinical Investigation*, 52(2), 350.

Liu, P., Seo, T. S., Beyor, N., Shin, K. J., Scherer, J. R., & Mathies, R. A. (2007). Integrated portable polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microsystem for rapid forensic short tandem repeat typing. *Analytical chemistry*, 79(5), 1881-1889.

- MacDougald O. A., & Lane M. D. (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 345-373.
- Mackay A. M., Beck, S. C., Murphy, J. M., Barry, F. P., Chichester, C. O., & Pittenger, M. F. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue engineering*, 4(4), 415-428.
- Mantero S, Remuzzi A, Raimondi MT, Ahluwalia A. Fondamenti di Ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa. Pàtron Editore, Bologna, 2009.
- Mao, X., Waldeisen, J. R., & Huang, T. J. (2007). “Microfluidic drifting”—implementing three-dimensional hydrodynamic focusing with a single-layer planar microfluidic device. *Lab on a Chip*, 7(10), 1260-1262.
- Markarian, N., Yeksel, M., Khusid, B., Farmer, K. R., & Acrivos, A. (2003). Particle motions and segregation in dielectrophoretic microfluidics. *Journal of Applied physics*, 94(6), 4160-4169.
- Mohamadnejad M., K. Alimoghaddam, M. Mohyeddin-Bonab et al., “Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stemcell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis,” *Archives of Iranian Medicine*, vol. 10, no. 4, pp. 459–466, 2007.
- Murphy M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & molecular medicine*, 45(11), e54.
- Nagaya N., K. Kangawa, T. Itoh et al., “Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat
- Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Ulkus, L., ... & Toner, M. (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450(7173), 1235-1239.
- Nueringer I. P. and S. H. Randell, “Lung stem cell update: promise and controversy,” *Mondali Arch Chest Discovery*, vol. 65, pp. 47–51, 2006.
- Ohno, K. I., Tachikawa, K., & Manz, A. (2008). Microfluidics: applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry. *Electrophoresis*, 29(22), 4443-4453.

- Oreffo, R. O., Cooper, C., Mason, C., & Clements, M. (2005). Mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reviews*, 1(2), 169-178.
- Park, S. R., Oreffo, R. O. C., & Triffitt, J. T. (1999). Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone*, 24(6), 549-554.
- Park, J. S., Song, S. H., & Jung, H. I. (2009). Continuous focusing of microparticles using inertial lift force and vorticity via multi-orifice microfluidic channels. *Lab on a Chip*, 9(7), 939-948.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, 284(5411), 143-147.
- Plouffe, B. D., Kniazeva, T., Mayer, J. E., Murthy, S. K., & Sales, V. L. (2009). Development of microfluidics as endothelial progenitor cell capture technology for cardiovascular tissue engineering and diagnostic medicine. *The FASEB Journal*, 23(10), 3309-3314.
- Scott R. and C. F. Hyer, "Role of cellular allograft containing mesenchymal stemcells in high risks foot and ankle reconstruction," *Foot and Ankle Surgery*, vol. 52, no. 1, pp. 32–35, 2013.
- Shafiee A.,M. Soleimani,G.A.Chamheidari et al., "Electrospun nanofiber-based regeneration of cartilage enhanced by mesenchymal stem cells," *Journal of Biomedical Materials Research A*, vol. 99, no. 3, pp. 467–478, 2011.
- Smith, J. P., Lannin, T. B., Syed, Y. A., Santana, S. M., & Kirby, B. J. (2014). Parametric control of collision rates and capture rates in geometrically enhanced differential immunocapture (GEDI) microfluidic devices for rare cell capture. *Biomedical microdevices*, 16(1), 143-151.
- Sorrell J. M., M. A. Baber, and A. I. Caplan, "Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation," *Tissue Engineering A*, vol. 15, no. 7, pp. 1751–1761, 2009. "model of dilated cardiomyopathy," *Circulation*, vol. 112, no. 8, pp. 1128–1135, 2005.
- Stoff A., S. T. Moore, T. M. Numnum et al., "Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation," *Experimental Dermatology*, vol. 18, no. 4, pp. 362–369, 2009.

- Stott, S. L., Hsu, C. H., Tsukrov, D. I., Yu, M., Miyamoto, D. T., Waltman, B. A., ... & Toner, M. (2010). Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(43), 18392-18397.
- Sutton M. T., & Bonfield, T. L. (2014). Stem cells: innovations in clinical applications. *Stem cells international*, 2014.
- Takagi, J., Yamada, M., Yasuda, M., & Seki, M. (2005). Continuous particle separation in a microchannel having asymmetrically arranged multiple branches. *Lab on a Chip*, *5*(7), 778-784.
- Takahashi M., T.-S. Li, R. Suzuki et al., "Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury," *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*, vol. 291, no. 2, pp. H886–H893, 2006.
- Tzouvelekis A., A. Antoniadis, and D. Bourus, "Stem cell therapy in pulmonary fibrosis," *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, vol. 17, no. 5, pp. 368–373, 2011.
- Van Poll D., B. Parekkadan, C.H. Cho et al., "Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo," *Hepatology*, vol. 47, no. 5, pp. 1634–1643, 2008.
- Vickers, D. A., Chory, E. J., & Murthy, S. K. (2012). Separation of two phenotypically similar cell types via a single common marker in microfluidic channels. *Lab on a Chip*, *12*(18), 3399-3407.
- Wang, S., Liu, K., Liu, J., Yu, Z. T. F., Xu, X., Zhao, L., ... & Tseng, H. R. (2011). Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers. *Angewandte Chemie International Edition*, *50*(13), 3084-3088.
- Watkins N, Venkatesan BM, Toner M, Rodriguez W, Bashir R (2009) A robust electrical microcytometer with 3-dimensional hydrofocusing. *Lab Chip* 9:3177–3184
- Weiss D. J., L. A. Ortiz, A. Panoskaltis-Mortari, and D. J. Prockop, "Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases," *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 5, pp. 637–667, 2008.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, *442*(7101), 368-373.

Stone, H. A., Stroock, A. D., & Ajdari, A. (2004). Engineering flows in small devices: microfluidics toward a lab-on-a-chip. *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 36, 381-411.

Yamada, M., Nakashima, M., & Seki, M. (2004). Pinched flow fractionation: continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel. *Analytical chemistry*, 76(18), 5465-5471.

Yamada, M., & Seki, M. (2005). Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics. *Lab on a Chip*, 5(11), 1233-1239.

Yang, J., Li, C. W., & Yang, M. (2004). Hydrodynamic simulation of cell docking in microfluidic channels with different dam structures. *Lab on a Chip*, 4(1), 53-59.

Zhu, B., & Murthy, S. K. (2013). Stem cell separation technologies. *Current opinion in chemical engineering*, 2(1), 3-7.

<http://www.elveflow.com/microfluidic-reviews-and-tutorials/microfluidics-and-microfluidic-devices-a-review>