

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



FACOLTA' DI INGEGNERIA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

TESI DI LAUREA

**AUTOMAZIONE E CONTROLLO DI
PIATTAFORME MICROFLUIDICHE
PER COLTURE CELLULARI
ON A CHIP**

Laureando: Emanuele Grasso
Relatore: Ing. Nicola Elvassore
Correlatore: Ing. Onelia Gagliano

16 luglio 2012

Anno Accademico 2011-2012

Alla mia famiglia...

3.1.2	Sistema <i>liquid-handling</i> integrato on a chip	37
3.1.2.1	Studio del comportamento fluidodinamico mediante analisi di immagini	37
3.2	Studio e validazione dell'incubatore <i>on the bench</i>	40
3.2.1	Analisi preliminare su terreni cellulari per C2C12	40
3.2.2	Analisi di colture cellulari on a chip in statica	43
3.2.3	Applicazione del sistema ad una <i>long-term-culture</i>	47
4	<u>CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI</u>	51
4.1	Conclusioni	51
4.2	Sviluppi futuri	52
	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	53

SOMMARIO

L'analisi e lo studio di colture cellulari *on a chip* necessita di strumenti che consentano, mediante specifici software, il controllo automatico ed in tempo reale dell'ambiente cellulare *in vitro*. Attualmente, i dispositivi in grado di realizzare l'ambiente idoneo per la crescita ed il mantenimento cellulare sono spesso ingombranti, assicurano poca stabilità alle colture cellulari e non permettono di osservare l'evoluzione dell'ambiente cellulare in modalità *real time*.

L'obiettivo di questa tesi è quello di realizzare un prototipo di incubatore *on the bench* per colture cellulari applicabili alla microfluidica. Per il controllo automatico ed operatore-indipendente dei chip microfluidici e dell'incubatore stesso, sono stati elaborati dei *software* che garantiscano robustezza ed affidabilità durante l'esecuzione degli esperimenti.

Nel Capitolo 1 verrà discussa l'importanza dell'automazione, mediante sistemi di controllo, per gestire macchine e processi, sottolineando, in particolare, le sue applicazioni nei sistemi microfluidici. Seguiranno le motivazioni e lo scopo della tesi.

Nel Capitolo 2 verranno descritte le metodologie utilizzate per lo sviluppo e l'implementazione dell'incubatore *on the bench* e dei relativi sistemi di controllo. Verrà, inoltre, descritto il protocollo utilizzato per la realizzazione di un chip microfluidico e dei dispositivi utilizzati per lo svolgimento degli esperimenti.

Infine, nel Capitolo 3, verranno testati ed analizzati i dispositivi *liquid-handling* utilizzati valutando le loro prestazioni fluidodinamiche *on a chip* mediante analisi di immagini. Inoltre, mediante esperimenti automatizzati su colture cellulari *on a chip*, verrà testato e validato l'incubatore *on the bench* sviluppato durante il lavoro di tesi.

Nell'epilogo, verranno espone le conclusioni ed i possibili sviluppi futuri del lavoro di tesi fin qui condotto.

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE E STATO DELL'ARTE

L'automazione è una disciplina che studia le metodologie e le tecnologie che permettono la gestione di *macchine e processi*, mediante l'utilizzo di *sistemi di controllo*, al fine di rendere tali operazioni, per quanto possibile, operatori-indipendenti ed eseguibili per tempi molto lunghi. In questo lavoro di tesi ci occuperemo di automazione applicata al campo biologico.

I vantaggi dell'automazione sono molteplici, tra questi la possibilità di sostituire la macchina all'uomo in compiti monotoni, ripetitivi e rischiosi, oppure in compiti che vanno al di là delle possibilità umane, in termini di dimensioni, peso e velocità; questo si traduce in risparmio delle risorse economiche ed energetiche. Di contro, questa modalità di lavoro comporta un elevato costo iniziale, dovuto all'acquisto dei macchinari, come anche dei controlli periodici della strumentazione.

Questo progetto di tesi è nato dalla necessità di introdurre l'automazione in applicazioni microfluidiche, proprio per l'elevata precisione che richiede questa disciplina, dovendo lavorare con volumi di fluido dell'ordine di decine di micro litri. La robotizzazione permette, infatti, una riduzione del tempo di lavoro (possibilità di lavorare in parallelo), una maggiore precisione, organizzazione e semplicità di un processo. Inoltre, la sperimentazione in campo biologico richiede strumenti sempre più complessi e tecnologici, una tempistica ridotta e l'utilizzo di tecnologie "*high-throughput*", che consentono la generazione di una notevole quantità di dati, difficili da gestire, se non con strumenti studiati *ad hoc*. Tutto questo si traduce in una gestione globale complessa e, sebbene si assista ad una continua evoluzione tecnologica, risulta ancora complicato riuscire ad organizzare, eseguire e controllare in maniera efficiente questo tipo di sperimentazione.

Tutte queste problematiche, ancora non risolte del tutto, sono state un'ottima motivazione per lavorare su questa tesi, che aveva come obiettivo quello di sviluppare sistemi microfluidici automatizzati, che presentino un'efficiente metodologia di estrazione ed analisi dei dati.

1.1 Sistemi microfluidici per colture cellulari

La microfluidica è una tecnologia, che consente di lavorare con volumi di fluidi dell'ordine dei microlitri, usando canali delle dimensioni di alcune decine o centinaia di micrometri [Whitesides George M., 2006].

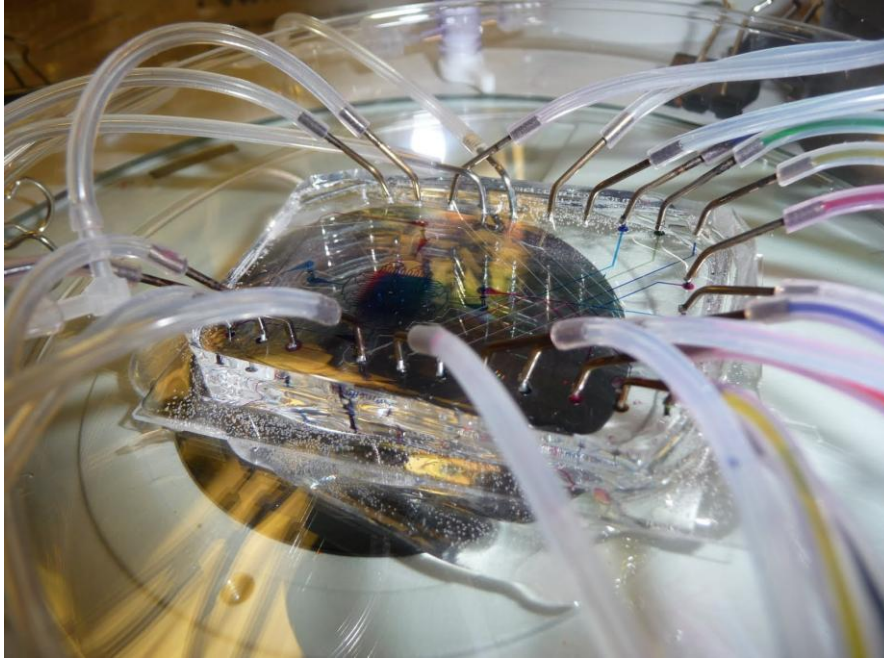


Figura 1.1: Lab-on-a-chip per colture cellulari realizzata nel laboratorio BIOERA.

In queste condizioni il sistema è caratterizzato da un numero di Reynolds (Re) inferiore a $2 \cdot 10^3$, in quanto i fluidi si muovono all'interno dei canali in regime di moto laminare. Il ridotto volume dei canali determina un'elevata superficie specifica che consente un rapido scambio di materia attraverso pareti permeabili. La combinazione di queste due caratteristiche consente di creare sistemi che presentano rapidi gradienti di materia ad elevata risoluzione, fino alla scala cellulare. In questo modo si possono controllare in modo localizzato le condizioni sperimentali del sistema e studiare le risposte cellulari ad un determinato input esterno [Kim et al., 2007].

Mediante la microfluidica, si è in grado di osservare ed analizzare su un sistema effetti diversi, generando grandi quantità di dati da un singolo esperimento; questo rappresenta un ottimo vantaggio della tecnologia *lab on chip*, in quanto permette di controllare processi multi-parametrici con conseguente risparmio di tempo e

denaro [Zhang X. *et al*, *Lab on a Chip*, 2006].

Infatti, lavorare in campo biologico su scala micrometrica permette il controllo di segnali del microambiente extracellulare, in particolare delle interazioni delle cellule con la matrice extracellulare o con le altre cellule stesse. Per i tessuti che *in vivo* sono altamente perfusi, questa tecnica, consente di simulare in modo accurato il microambiente in vivo, dove le cellule sono a stretto contatto con il sistema microvascolare. Un controllo simile a livello cellulare non sarebbe possibile in colture statiche [Kim *et al.*, 2007].

Inoltre, negli ultimi anni sono state sviluppate piattaforme microfluidiche contenenti una serie di micro-dispositivi integrati, come micro-pompe e micro-valvole, incrementando l'applicazione di tale tecnologia nella ricerca chimica e biologica [Melin J. *et al.*, 2007].

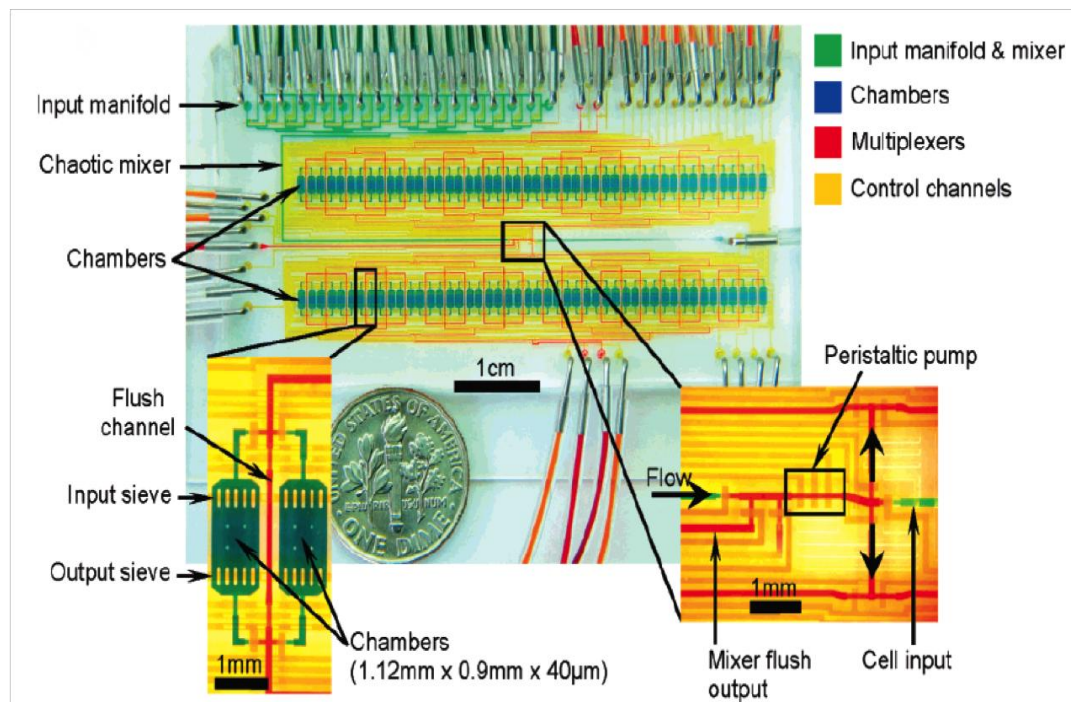


Figura 1.2: Chip microfluidico con controllo di micro-pompe e micro-valvole integrato.

Pertanto, risulta estremamente importante l'automazione ed il controllo *real time* di questi dispositivi, al fine di riuscire a riprodurre *in vitro* un ambiente fisiologico simile a quello *in vivo*. Ad esempio, il controllo dell'apertura e della chiusura dei canali, mediante micro-valvole pneumatiche, permette di regolare la distribuzione spazio-temporale dei fattori di crescita, dei nutrienti e delle proteine necessari alla

sopravvivenza ed alla crescita delle colture cellulari, nonché allo studio della risposta del sistema in seguito all'innesco di uno stimolo. Dunque, è facile intuire, come l'automazione di un processo microfluidico, mediante sistemi di controllo, è un requisito fondamentale ed importantissimo per eseguire esperimenti in maniera efficiente, sicura e il meno operatore-dipendente possibile.

1.2 Obiettivi della tesi

Alla luce delle considerazioni fatte nei paragrafi precedenti, gli obiettivi di questo lavoro di tesi sono quelli di studiare e sviluppare un incubatore *on the bench* per la crescita ed il mantenimento di colture cellulari *on a chip*. Il sistema deve essere totalmente automatizzato per condurre esperimenti in maniera robusta, sia dal punto di vista organizzativo che operativo.

Inoltre, volendo condurre esperimenti anche in dinamica, per ricreare situazioni fisiologiche caratteristiche dei sistemi *in vivo*, ci si è posto l'ulteriore obiettivo di sviluppare dei sistemi *liquid-handling*. A tal proposito, sono stati scelti e studiati due tipi di sistemi di movimentazione fluidica: il primo è un sistema esterno, rappresentato da pompe che lavorano ad un altissima precisione e con bassissimi volumi di fluido (ordine di μL), mentre il secondo, è un sistema integrato nella piattaforma microfluidica stessa mediante micro-valvole e micro-pompe pneumatiche (ordine di μL).

Risulta quindi evidente come l'applicazione dell'automazione alla tecnologia *lab on chip* possa apportare un grande salto di qualità nelle potenzialità degli attuali sistemi di coltura su microscala.

CAPITOLO 2 – MATERIALI E METODI

In questo capitolo verranno descritti tutti gli strumenti necessari per la realizzazione, la gestione ed il controllo dell'incubatore a banco, applicato alla microfluidica; verranno, pertanto, descritti anche i materiali e le tecniche con cui sono stati fabbricati i chip microfluidici, utilizzati nelle prove sperimentali.

2.1 Requisiti tecnici

Gli incubatori (Figura 2.1) sono dei dispositivi in grado di mantenere costanti nel tempo determinati parametri, quali temperatura, umidità e CO₂, al fine di permettere la crescita ed il mantenimento di colture cellulari o di un determinato processo biologico.



Figura 2.1: Incubatore classico di CO₂ per colture cellulari.

In particolare le cellule sono mantenute nell'incubatore in condizioni costanti di temperatura (37 °C), di umidità (95 %) e di PH (7,4 unità); la stabilità del PH, che tenderebbe ad acidificare per effetto del metabolismo cellulare, è garantita dalla pressione parziale di CO₂ mantenuta al 5%.

Nel campo della ricerca medica e biomedica gli incubatori per colture cellulari risultano di fondamentale importanza, in quanto l'utilizzo di colture cellulari in un ambiente idoneo permette di realizzare esperimenti economici, riproducibili, con delle condizioni al contorno semplificate ed eticamente corretti.

In questo lavoro di tesi si è progettato e realizzato un incubatore “on the bench” per rendere gli esperimenti microfluidici più sicuri, stabili, precisi e con le condizioni di lavoro desiderate.

La realizzazione di un incubatore a banco comporta molti vantaggi rispetto ad un classico incubatore: oltre all’evidente riduzione di ingombro spaziale, permette infatti un controllo selettivo sulle variabili che entrano in gioco durante un esperimento; il fatto di non dovere spostare la coltura da un posto ad un altro per condurre le normali procedure di monitoraggio cellulare, implica di non inserire variabili superflue o dannose per le cellule stesse, che potrebbero compromettere l’esito dell’intero esperimento. La figura 2.2 riporta lo schema a blocchi delle componenti dell’incubatore *on the bench*.

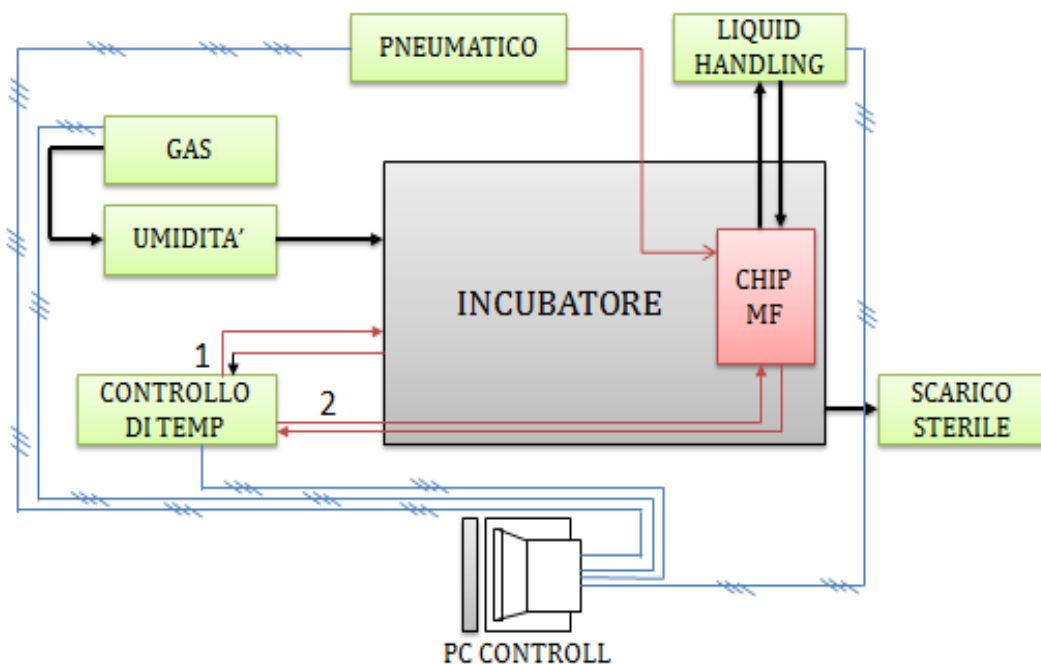


Figura 2.2: Schema a blocchi dell'incubatore *on the bench* realizzato.

In particolare risulta dotato di strumenti di gestione per:

- il controllo di temperatura a 37 °C
- il controllo di umidità al 95%
- il controllo della pressione parziale di CO₂ al 5%

e da sistemi responsabili della movimentazione fluidica *on a chip* distinti in:

- sistema liquid handling esterno
- controllo pneumatico

Tutte queste componenti verranno ampiamente descritte nei paragrafi successivi.

2.2 Incubatore per colture cellulari

L'incubatore è stato realizzato con l'ausilio di una scatola rettangolare (240x190x90 mm) in plastica impermeabile, a tenuta stagna, del volume di 4104 cm³.

Il primo passo è stato quello di scegliere un'area dedicata ad accogliere la coltura cellulare, in prossimità della quale deve essere garantito un controllo locale della temperatura più sensibile rispetto alle altre aree. Pertanto è stato realizzato un doppio controllo di temperatura: uno locale, per il controllo della zona riservata alla coltura cellulare, e l'altro globale, per regolare la temperatura dell'aria nell'intero incubatore. In particolare, nella regione adibita alla coltura cellulare è stato inserito un blocco in alluminio (150x70x20 mm), al fine di tamponare eventuali dispersioni di calore dovute alla necessità di aprire la scatola durante il corso dell'esperimento; tale blocco, essendo caratterizzato da un'elevata capacità termica, è risultato essere un'efficiente soluzione per limitare le oscillazioni e mantenere costante il livello di temperatura desiderato, grazie al calore che è in grado di immagazzinare.

L'incubatore è stato dotato di un input e di un output di CO₂, fornita da un sistema esterno, da inlet/outlet microfluidici in grado di consentire l'ingresso di eventuali fluidi (es. medium), e di connessioni elettriche per il collegamento al computer.

2.2.2 CO₂-Controller

Il biossido di carbonio, conosciuto principalmente come anidride carbonica, è uno dei principali gas responsabili dell'effetto serra e, sebbene la sua concentrazione nell'atmosfera sia appena pari al 5% dell'intero volume, gioca un ruolo fondamentale nei processi di tutti gli esseri viventi; dunque è una componente indispensabile per la crescita e la sopravvivenza delle colture cellulari.

Nel caso specifico, la pressione parziale di CO₂ al 5% è stata garantita mediante l'utilizzo del CO₂-Controller (Leica), mostrato in Figura 2.3, connesso direttamente al computer tramite un cavo d'interfaccia RS-232.



Figura 2.3: CO₂-Controller e sistema di umidificazione.

Il sistema di CO₂-Controller permette di impostare diversi parametri, come il valore nominale di CO₂, la posizione della pompa (ciascuna associata ad una differente portata) e la modalità di lavoro, remota o normale, a seconda che venga controllato o meno da un dispositivo esterno.

Nello specifico, lo strumento in esame dispone di cinque diverse modalità di portata, ciascuna delle quali risulta corrispondente ad una diversa posizione di pompa. Nella Tabella 2.1 si riportano i valori di portata associati alla corrispondente posizione della pompa.

Pump	Flow rate (mL/s)	Flow rate (mL/min)	Flow rate (mL/h)
1	3,6	216	12960
2	5	300	18000
3	6,4	386	23143
4	7,5	450	27000
5	10,6	635	38188

Tabella 2.1: Possibili posizioni della pompa del CO₂ -controller con le rispettive portate

Esiste anche la posizione numero 0 che corrisponde ad un flow rate nullo (posizione di riposo). In Figura 2.4 è riportato lo schema a blocchi del principio di funzionamento del CO₂-Controller.

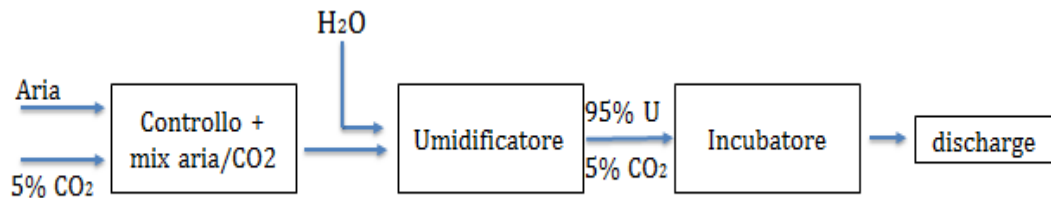


Figura 2.4: Schema a blocchi del principio di funzionamento del CO₂-Controller.

Il controllore ha come input due ingressi separati: uno di aria fornita dall'ambiente circostante e l'altro di CO₂ fornita dalla linea presente in laboratorio; queste due componenti vengono mescolate dal CO₂-Controller, secondo opportune proporzioni (5% di CO₂, 95% di aria). L'uscita del controllore viene mandata al sistema di umidificazione, costituito da acqua che gorgoglia ad una temperatura di 37 °C mediante una piastra riscaldante. Risulta dunque evidente che l'umidità e la CO₂ siano strettamente correlate: l'aria umidificata a 37 °C con il 5% di CO₂ verrà mandata all'incubatore mediante un tubo da gas a bassa pressione di 1/8 di pollice, agganciato all'incubatore mediante raccordi istantanei. L'incubatore è stato dotato anche di un output per la CO₂, convergente in una provetta (scarico sterile) riempita con acqua distillata per consentire il riciclo dell'aria e, al tempo stesso, impedire che durante l'esperimento possa entrare aria contaminata dall'esterno, mantenendo così inviolate le condizioni di lavoro in ambiente sterile.

2.2.1.1 Implementazione user-friendly

Per il controllo e la gestione del CO₂ controller attraverso il computer è stata realizzata un'interfaccia utente con il software labVIEW™ (Figura 2.5), limitando al minimo l'intervento dell'operatore.

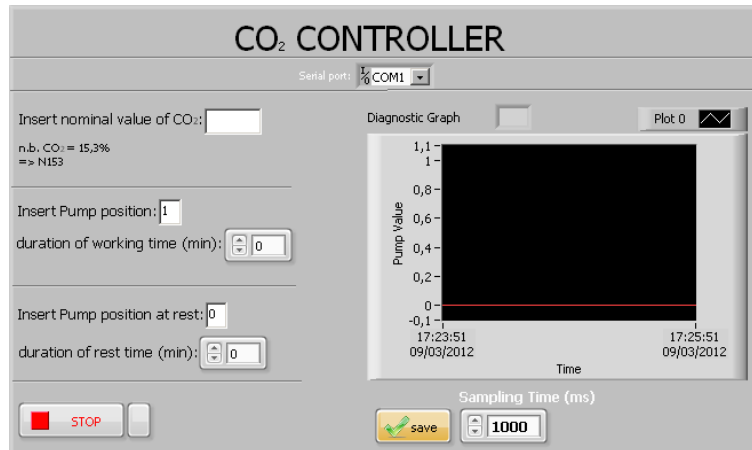


Figura 2.5: Front panel del programma labVIEW™ realizzato per la gestione ed il controllo automatico del CO₂-Controller.

Questo programma consente un utilizzo dello strumento automatico e dunque operatore indipendente, permettendo lo svolgimento di esperimenti lunghi, anche dell'ordine delle settimane, in modalità overnight e con un'elevata precisione.

In particolare, dall'interfaccia labVIEW™ vengono selezionati: la porta seriale del computer alla quale il CO₂ controller è collegato per il riconoscimento dello strumento, il valore nominale di CO₂, la posizione della pompa e il corrispettivo tempo di lavoro desiderato ed, infine, la posizione della pompa a riposo (0 di default) con la rispettiva durata. Queste operazioni, relative allo switch delle posizioni della pompa, vengono eseguite in maniera ciclica e continua, senza alcun controllo di feedback, finché l'operatore non decide di terminare il programma. L'interfaccia è stata dotata anche di un pulsante per il salvataggio dei dati e di un grafico per effettuare la diagnostica del funzionamento dello strumento.

Come mostra la figura 2.6, in questo lavoro di tesi si è deciso di lavorare nella seguente modalità:

- perfusione di CO₂ per 30 min con pompa in posizione 2;
- riposo per 30 min con pompa in posizione numero 0.

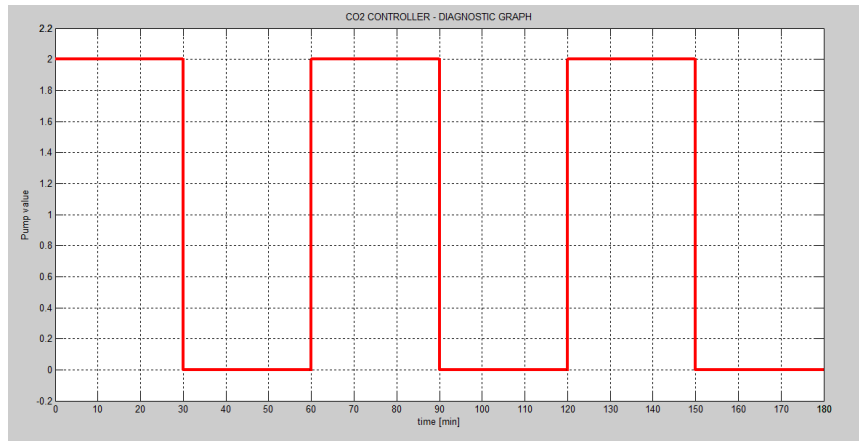


Figura 2.6: Andamento temporale del CO₂-controller (switch della posizione della pompa tra 0 e 2 ogni 30 min).

La scelta di tale tempistica, che è giustificata dal fatto di voler inserire un volume di CO₂ pari al doppio del volume della scatola, come mostra la (1), assicura un riciclo dell'aria anche nelle zone prossime ai bordi ed agli spigoli:

$$t_{p_2} = \frac{V_{in}}{Q_2} = \frac{2 * V}{Q_2} = \frac{2 * 4104}{300} = 28 \quad \text{min} \quad (1)$$

dove V_{in} è il volume di CO₂ all'ingresso dell'incubatore (espresso in cm³), Q_2 è la portata di CO₂ garantita dalla pompa 2 (espressa in mL/min) e V è il volume dell'incubatore (espresso in cm³).

2.2.2 Controllo di temperatura

Un altro parametro che bisogna monitorare durante gli esperimenti di coltura cellulare *in vitro* è la temperatura, che deve essere mantenuta costante al valore di 37 °C.

Nella fattispecie, è stato realizzato un doppio controllo di temperatura: uno a livello globale e uno a livello locale: entrambi si basano sul medesimo principio di funzionamento rappresentato dallo schema a blocchi mostrato in Figura 2.7.

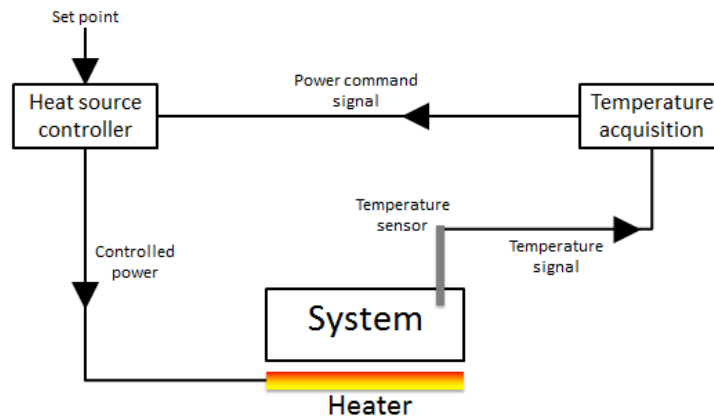


Figura 2.7: Schema a blocchi del principio di funzionamento del doppio controllo di temperatura.

Un sensore rileva la temperatura interna dell'incubatore, che viene subito inoltrata ad un sistema di acquisizione; tale valore, mediante un sistema di controllo, viene confrontato con quello di set-point, selezionato dall'operatore, registrandone quindi la differenza. Per la gestione della temperatura sono stati realizzati due tipi di controllo: uno di tipo PID (Proporzionale-Integrativo-Derivativo) e uno di tipo ON-OFF, usando rispettivamente un output analogico nel primo e un output digitale nel secondo. Poiché le prestazioni dei due sistemi di gestione risultano pressoché uguali, al fine di garantire una ridotta complessità computazionale, è stato scelto il controllo ON-OFF.

In particolare, il sistema di temperatura a *livello globale* (responsabile della temperatura dell'aria che circola in tutto l'incubatore) è stato realizzato utilizzando una basetta, di dimensioni 10x60x40 mm, in cui è stata inserita una resistenza cilindrica a cartuccia, che in base alla temperatura registrata da un sensore (modello Pt100), viene accesa o spenta: in pratica quando è accesa, la resistenza ha la funzione di riscaldare la basetta; inoltre, sopra la basetta è stato posto un dissipatore, anch'esso metallico, di dimensioni 100x50x30 mm, in modo da mantenere le due componenti in contatto. La basetta riscaldandosi, per conduzione, trasmette il calore al dissipatore il quale porta la temperatura dell'aria globale al valore desiderato. Il controllo è stato dotato anche di un sistema di raffreddamento ad aria allo scopo di diffondere, per convezione, l'aria riscaldata in tutta la scatola.

Il controllo di *temperatura locale*, poiché responsabile esclusivamente della temperatura in prossimità della coltura cellulare, necessita di una maggiore sensibilità e precisione. In particolare la coltura cellulare viene posta sopra una resistenza realizzata con un vetrino rivestivo in ITO (Indium Tin Oxide) al quale è applicata una differenza di potenziale (utilizzando un alimentatore da 24V) tramite due fili di rame collegati alle due estremità del vetrino (Figura 2.8).

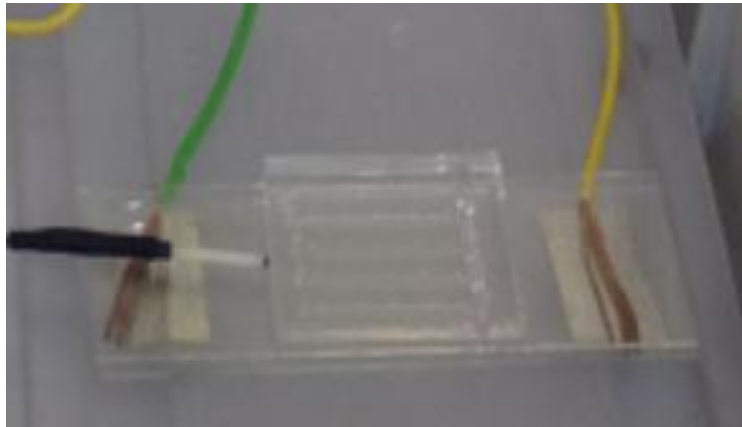


Figura 2.8: Sistema di riscaldamento locale realizzato con substrato ITO.

Per rilevare la temperatura è stata utilizzata una termoresistenza Pt100, posizionata nella zona adibita alla coltura cellulare, che accende e spegne l'alimentatore in modo da controllare il riscaldamento del vetrino. Dunque, quando il valore della temperatura locale registrata è inferiore al valore di set point impostato, la resistenza si trova allo stato "ON" (alimentatore acceso), mentre quando raggiunge il valore di set point, la resistenza subisce uno switch nello stato "OFF" (alimentatore spento).

Il principio di funzionamento di questi due controlli è molto efficiente ma al tempo stesso complesso, dunque impossibile da realizzare manualmente. Per un controllo ed una gestione automatica ed efficace dei due livelli di temperatura è stato quindi necessario realizzare un programma mediante il software labVIEW™.

2.2.2.1 Implementazione user-friendly

Si è scelto di utilizzare il software labVIEW™ (**L**aboratory **V**irtual **I**nstrumentation **E**ngineering **W**orkbench) in quanto assicura un'elevata precisione ed affidabilità nelle operazioni sopra discusse, garantendo al tempo stesso una relativa semplicità di utilizzo.

L'automazione del doppio controllo di temperatura mediante labVIEW™ ha richiesto l'utilizzo dei seguenti componenti:

- La piattaforma della National Instrument (NI) modello NI cDAQ-9188, che permette di interfacciare fino ad un numero massimo di otto moduli con il computer, mediante collegamento con una porta USB;
- Il modulo NI-9472 per la generazione di segnali digitali con un potenziale di 24V. Il modulo dispone di 8 output fisici per consentire il collegamento con dispositivi elettrici esterni;
- Il modulo NI-9217 per l'acquisizione di segnali analogici che presenta 4 input analogici da 100 Ω ;

In Figura 2.9 sono mostrate le componenti sopra descritte.

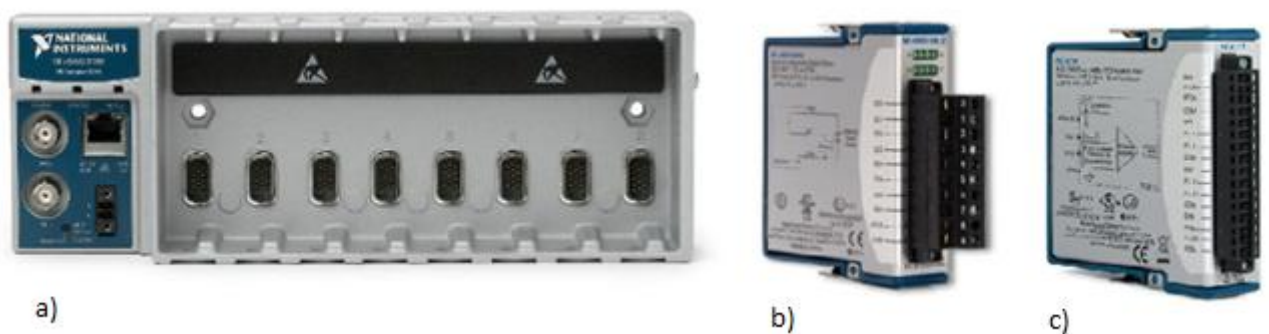


Figura 2.9: Chassis NI cDAQ-9188 (a), dei moduli NI-9472 (b) e NI-9217 (c).

La Figura 2.10 mostra l'interfaccia utente creata con labVIEW™ per avere un controllo automatizzato della temperatura.

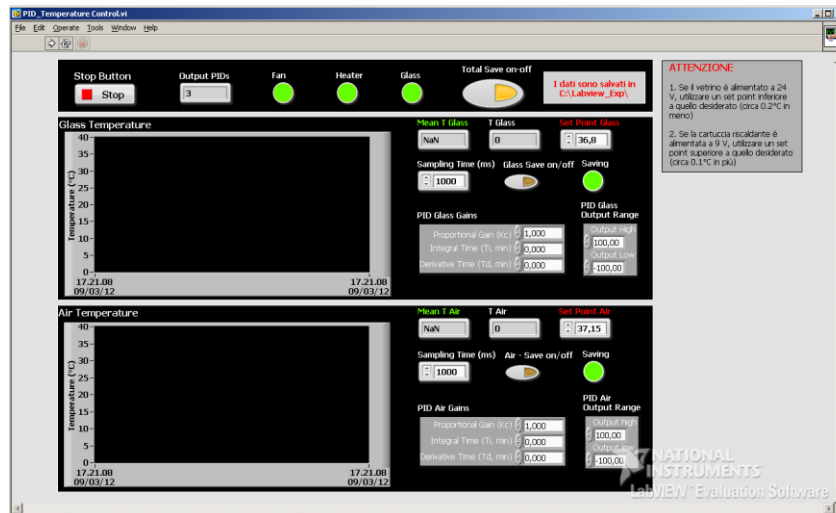


Figura 2.10: Front-panel del programma labVIEW™ realizzato per il controllo e la gestione del doppio controllo di temperatura.

Il front panel è stato diviso in due sezioni: *Glass Temperature*, responsabile del controllo di temperatura locale, ed *Air Temperature*, responsabile del controllo di temperatura globale. In entrambe le sezioni è possibile effettuare il salvataggio dei dati e selezionare manualmente i parametri del PID, se si decide di usare questo come controllore. Inoltre entrambe le sezioni sono state dotate di un grafico di diagnostica, che riporta l'andamento della temperatura in °C nel tempo, come mostra la Figura 2.11.

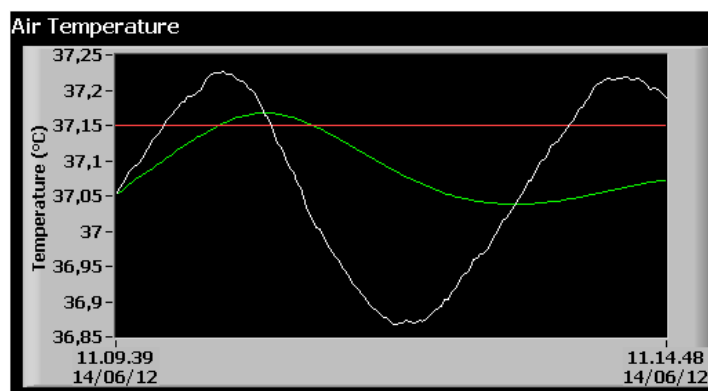


Figura 2.11: Grafico di diagnostica del programma labVIEW™ per il controllo della temperatura: la curva rossa rappresenta la temperatura di set-point, la curva verde la temperatura media e la curva bianca la temperatura reale.

La temperatura registrata dai due sensori è letta mediante il modulo NI-9217, mentre l'accendersi o lo spegnersi delle resistenze, dipendente dai valori di set-point utilizzati, è gestito dal modulo NI-9472.

Il grafico di diagnostica (Figura 2.12), eseguito al fine di valutare i tempi di risposta e le prestazioni del buffer termico, mostra come la temperatura, a partire da 26°C (temperatura ambiente), si assesta a 36,9 °C (temperatura di set-point) in 45 minuti circa.

Inoltre, volendo realizzare un incubatore che mantenga comunque i vantaggi di un incubatore classico, sono state testate le performance del controllo della temperatura a seguito dell'apertura volontaria dell'incubatore stesso; è necessario, infatti, assicurare una tenuta della temperatura anche quando l'incubatore viene aperto per le normali operazioni di monitoraggio delle colture cellulari, quali aggiunta di medium nelle riserve o controllo al microscopio della loro vitalità. Come mostra la Figura 2.12, la temperatura subisce una diminuzione (fino a circa 34 °C) che viene però recuperata nell'arco di 5 minuti circa; prove preliminari hanno dimostrato che tale salto di temperatura non compromette assolutamente lo stato della coltura cellulare né l'esito dell'esperimento, dimostrando pertanto che il sistema così progettato presenta delle ottime caratteristiche di buffer termico.

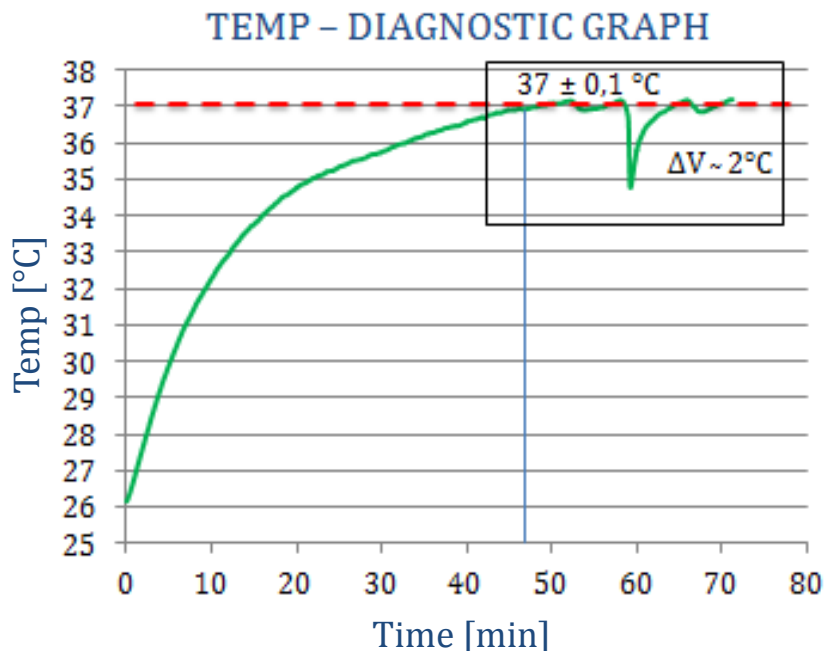


Figura 2.12: Andamento della temperatura a partire dal valore ambiente fino a convergere al valore di set point.

La figura 2.13 mostra l'incubatore *on the bench* realizzato, con tutte le componenti di gestione ad esso integrato.

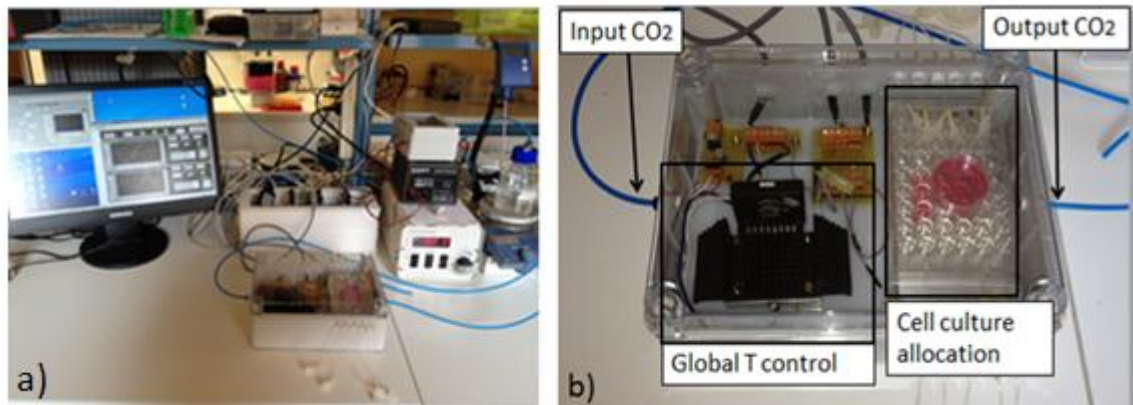


Figura 2.13: a) Incubatore on the bench e i sistemi esterni di controllo e gestione; b) Dettaglio dell'incubatore on the bench.

2.3 Gestione *on a chip*

2.3.1 La fabbricazione di piattaforme fluidiche

Per i suoi indiscutibili vantaggi, la microfluidica ha ormai un ruolo dominante nel campo della chimica, biologia e più in generale della ricerca biomedica, permettendo di realizzare esperimenti rapidi, in parallelo e con poche quantità di reagenti [Quake S.R., 2005].

Pertanto l'incubatore "*on the bench*" è stato realizzato per condurre esperimenti di coltura cellulare in microfluidica: sono state, quindi, utilizzate piattaforme microfluidiche (*lab-on-a-chip*), su cui sono stati studiati dei protocolli di movimentazione fluidica *ad hoc*.

2.3.1.1 Fotolitografia

La fotolitografia è la tecnica di micro fabbricazione più ampiamente utilizzata per la produzione di circuiti integrati. Si tratta, infatti, di una tecnica a basso costo, facile da imparare, semplice da applicare e accessibile ad una vasta gamma di utenti. Allo stato dell'arte le tecniche fotolitografiche permettono la realizzazione di strutture di dimensioni dell'ordine di centinaia di nanometri grazie ad un'opportuna combinazione di esposizione alla luce UV ed alla scelta

dell'opportuno polimero fotosensibile (detto anche *photoresist* o semplicemente *resist*) [Xia Y. et al, 1998].

In particolare questa tecnica riguarda la reticolazione della “soluzione polimero” tramite una sorgente luminosa: tra il polimero e la sorgente viene inserita una fotomaschera che consente o esclude il passaggio dei raggi luminosi, in modo tale da riprodurre sul resist il disegno presente sulla fotomaschera.

Il processo può essere schematizzato in alcuni punti fondamentali, come mostra la Figura 2.14 [Vozzi G. et al, 2003]:

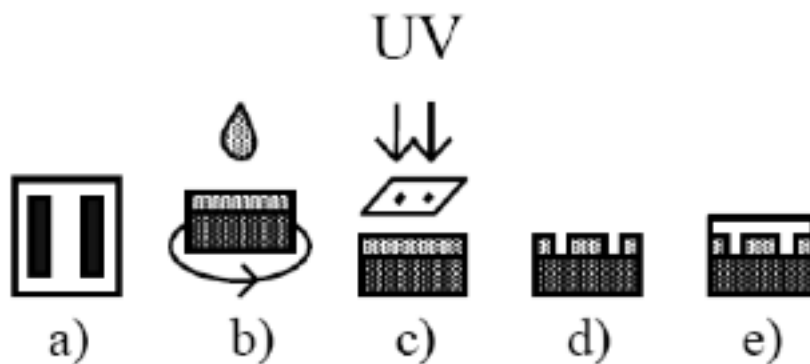


Figura 2.14: Schema del processo soft-litografico: a) fotomaschera con il disegno desiderato; b) spin coating del photoresist su wafer di silicio; c) esposizione a radiazioni UV attraverso la fotomaschera; d) sviluppo del photoresist; e) costruzione dello stampo in silicone.

In particolare:

- la prima fase prevede l'ideazione e la stampa del disegno della geometria desiderata su di una pellicola trasparente creando una fotomaschera;
- successivamente uno strato omogeneo di photoresist (dello spessore desiderato) viene depositato sul wafer di silicio, con l'ausilio dello spin-coater;
- il photoresist viene quindi esposto a radiazioni luminose UV, che saranno filtrate selettivamente dalla fotomaschera;
- le parti non reticolate vengono eliminate durante lo sviluppo del film con un opportuno solvente;
- la fase ultima del processo prevede la costruzione dello stampo, realizzato nel nostro caso in PDMS (*Polydimethylsiloxane*).

2.3.1.2 Produzione dello stampo in PDMS

Una volta preparato il master di photoresist sul wafer di silicio con la tecnica della fotolitografia si passa alla fase di realizzazione dello stampo in PDMS.

In particolare per ottenere il silicone (Sylgard 184®, Dow Corning) si miscelano due componenti: la base, che è un elastomero di media viscosità, ed un agente reticolante, secondo un rapporto 10:1. La miscela così ottenuta viene prima degasata in una camera sottovuoto (fino a 1 mmHg) e poi versata sulla superficie del wafer in silicio, subendo un secondo passaggio di sottovuoto per togliere l'aria inglobata durante la fase di versamento sul supporto.

La reticolazione tra base e agente reticolante avviene sia a temperatura ambiente che a temperature più alte: in particolare, può avvenire in 24 ore a 23 °C, in 2 ore a 65 °C, in 1 ora a 100 °C oppure in 15 minuti a 150 °C.

Una volta polimerizzato, il silicone ha un aspetto chiaro e trasparente, risulta dotato di ottime proprietà dielettriche ed è sufficientemente permeabile alle piccole molecole quali ossigeno ed anidride carbonica.

2.3.2 Sistemi di movimentazione fluidica

Questi dispositivi microfluidici necessitano di sistemi di movimentazione del fluido altamente robusti e precisi che possono essere esterni al chip oppure integrati all'interno della piattaforma microfluidica stessa, mediante l'utilizzo di micro valvole e micro pompe pneumatiche.

Nei paragrafi successivi verranno descritti entrambi i meccanismi adottati con i rispettivi meccanismi di funzionamento.

2.3.2.1 Sistema di movimentazione fluidica esterno

Il sistema di movimentazione fluidica esterno che si è deciso di impiegare è la pompa a siringa della TECAN modello CAVRO XR ROCKET (Figura 2.15), scelta per le sue ottime prestazioni in termini di accuratezza ed efficienza nella manipolazione di volumi di fluidi molto piccoli, dell'ordine di decine di μL .

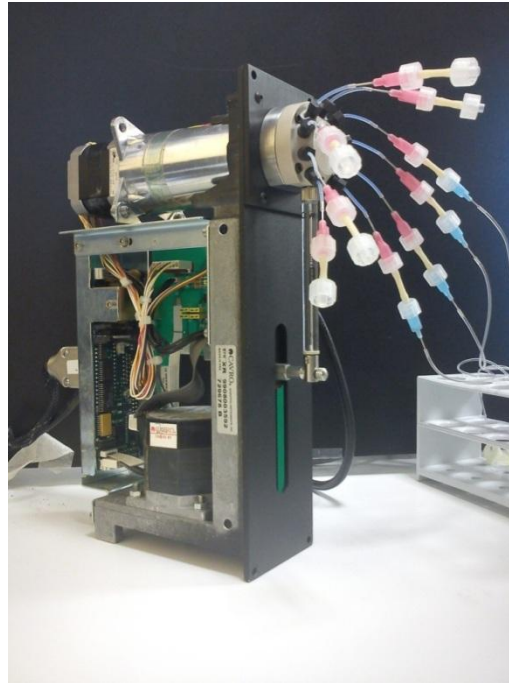


Figura 2.15: Cavro XR Rocket Pump.

La pompa, presenta 9 porte di distribuzione in grado di aspirare o erogare piccole quantità di fluido che vanno da un range di 1 μL a 50 μL . E' costituita da due motori: uno controlla il movimento rettilineo del pistone, la cui corsa completa è di 60 mm, mentre l'altro è responsabile dello *switch* delle valvole rotatorie, possibile in entrambe le direzioni; entrambi sono motori di tipo *stepper*. La velocità della corsa del pistone, che varia in un range che va da 1.2 sec ad un massimo di 20min per realizzare una corsa completa, può essere impostata a seconda del regime di moto che si vuole realizzare.

La Pompa a siringa richiede una corrente da 1.5 A ed una tensione di alimentazione da 24 VDC +/- 10% ed è collegata al computer mediante una porta USB.

Si riporta in Figura 2.16 lo schema delle connessioni della pompa al computer ed al chip microfluidico:

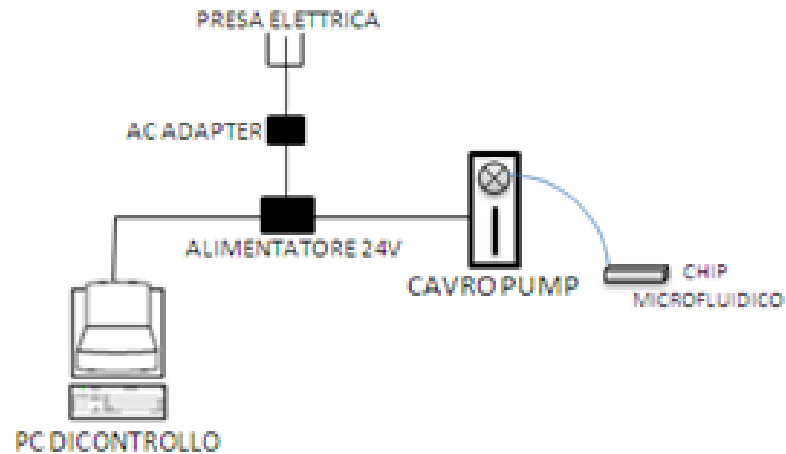


Figura 2.16: Schema a blocchi delle connessioni tra pc di controllo, pompa Cavro e piattaforma microfluidica.

2.3.2.1.1 Implementazione labVIEW™ user-friendly

La pompa a siringa è dotata di una serie di comandi, che permettono il suo funzionamento in diverse modalità in base all'applicazione desiderata; la gestione mediante il suo programma originale (Cavro Pump: Link32) non è di facile utilizzo e necessita di una conoscenza di base, da parte degli operatori, dei comandi della CAVRO XR. Inoltre non permette di inserire direttamente parametri importanti e frequentemente richiesti come la portata di lavoro, la quantità di fluido da aspirare o infondere ed il relativo tempo, obbligando l'operatore a continue proporzioni tra numeri di step e portata, a seconda della siringa utilizzata.

Per la sua ormai affermata versatilità, è stato utilizzato il software labVIEW™ per la realizzazione del software di gestione, modificando opportunamente l'originale configurazione step-to-step della pompa.

In Figura 2.17 si riporta l'interfaccia utente del programma realizzato:

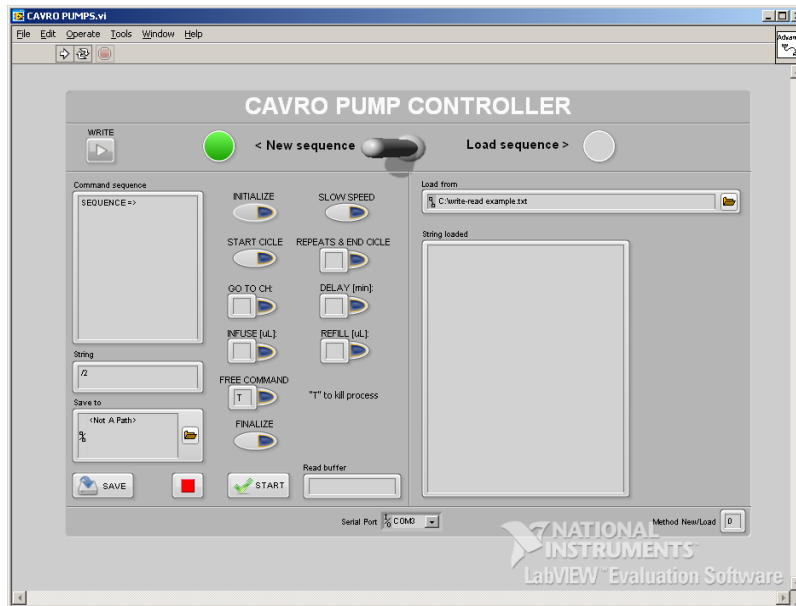


Figura 2.17: Front-panel del programma labVIEW™ realizzato per il controllo della Cavro XR Pump.

Questo programma consente di lavorare in due diverse modalità: una in cui vai a creare la sequenza di comandi (lato sinistro), l'altra in cui puoi caricare una sequenza di comandi utilizzata e salvata precedentemente (lato destro). Il programma è inoltre dotato di una finestra di diagnostica che riporta la sequenza di comandi creata, di un pulsante per il salvataggio dei dati e di un ulteriore pulsante di allarme che mi consente di interrompere l'esecuzione delle istruzioni in qualsiasi momento ed in maniera istantanea.

2.3.2.2 Sistema di movimentazione fluidica integrata nel chip

Il sistema di movimentazione fluidica integrato viene realizzato con l'ausilio di micro-valvole e micro-pompe pneumatiche. In questo caso, la piattaforma microfluidica risulta composta da due strati: il *flow layer*, dove sono presenti i canali dedicati allo scorrere del fluido, ed il *control layer*, posizionato sopra il *flow layer*, in cui sono presenti le micro-valvole e le micro-pompe. Come mostra la Figura 2.18, il canale di controllo, quando si trova in pressione, si rigonfia e deforma la membrana di separazione dei canali; questa deformazione comporta una riduzione della sezione di passaggio nel canale di flusso. La sezione viene progressivamente ridotta fino ad impedire al flusso del liquido di proseguire. In questo modo la micro valvola chiude il canale del liquido. La micro valvola viene

aperta quando il flusso di aria compressa si annulla e, di conseguenza, la membrana ritorna alla sua originaria forma e posizione, e la sezione di passaggio nei canali del flow layer aumenta fino a tornare alle dimensioni originali.

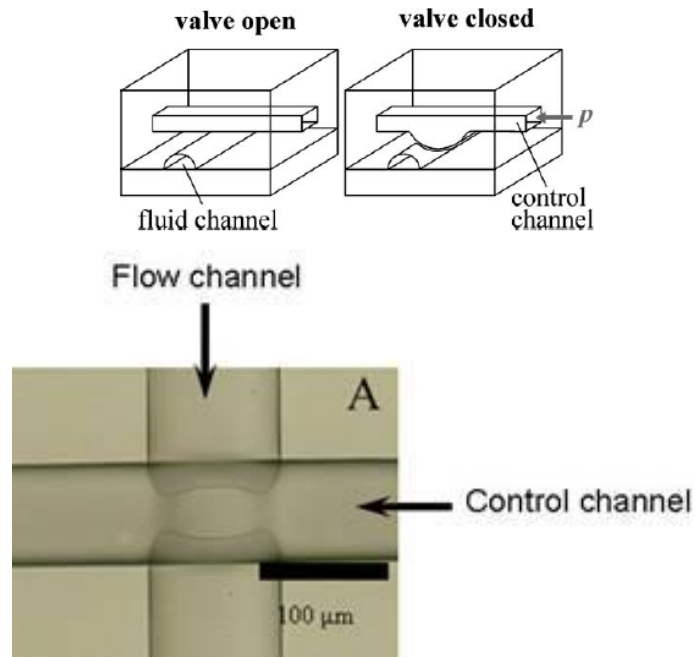


Figura 2.18: Funzionamento micro-valvola pneumatica.

Pertanto, sfruttando questo meccanismo, è stata realizzata una pompa pneumatica costituita da micro-valvole, allineate parallelamente e distanziate da poche centinaia di micron. Impostando dei cicli di apertura e chiusura, le micro-valvole ricreano il moto caratteristico della pompa peristaltica.

CAPITOLO 3 - RISULTATI SPERIMENTALI

In questo capitolo verranno descritte le prove sperimentali che sono state condotte, con i relativi risultati, al fine di verificare l'effettiva efficacia e funzionalità dei sistemi microfluidici automatizzati. In particolare, la prima parte del capitolo sarà dedicata all'analisi on a chip delle prestazioni fluidodinamiche dei due sistemi *liquid-handling* utilizzati: un sistema esterno al chip ed un sistema integrato nel chip microfluidico stesso. Seguiranno una serie di esperimenti, su colture cellulari on a chip, in differenti modalità di lavoro, per valutare e validare le prestazioni dell'incubatore *on the bench*, sviluppato durante questo lavoro di tesi.

3.1 Validazione dei sistemi *liquid-handling*

In questo paragrafo, verranno descritti e commentati tutti gli esperimenti compiuti per studiare e validare sperimentalmente i due sistemi *liquid-handling* scelti.

3.1.1 Validazione del sistema *liquid-handling* esterno

Come sistema di movimentazione fluidica esterno è stata usata la pompa a siringa della TECAN (CAVRO PUMP XR ROCKET). Nello specifico, sono state eseguite prove per verificare la precisione di lavoro della pompa durante la manipolazione fluidica (infuse/refill) anche mediante l'ausilio di analisi di immagini.

3.1.1.1 Analisi delle prestazioni di lavoro mediante simulazione di un esperimento over-night su colture cellulari

Come già enunciato nei capitoli precedenti, la microfluidica, è una tecnologia che lavora con bassissimi volumi di fluido. Dunque, è estremamente importante testare e calibrare, con un'elevata precisione ed accuratezza, tutta la strumentazione atta alla manipolazione fluidica.

A tal proposito è stato condotto un esperimento con l'obiettivo di verificare i seguenti aspetti:

1. precisione di infuse/refill della pompa per ogni canale e, contemporaneamente, la tenuta dei raccordi realizzati per connettere la pompa al chip.
2. corretto funzionamento del programma labVIEW™ per l'automazione ed il controllo della pompa, in modalità over-night.

In particolare, ciascun canale della pompa è stato collegato ad una eppendorf vuota, mediante tubi in tygon con un diametro interno di 0.51 mm ed un diametro esterno di 1.52 mm . Ciascuna eppendorf era stata precedentemente pesata a vuoto. Successivamente, la pompa è stata programmata per compiere 20 cicli, ognuno dei quali prevedeva un'infusione di 5 μ l da ogni canale (con una portata di 2.5 μ l/min), eccetto dal canale 9 che è stato utilizzato come sorgente; ciascun ciclo è stato programmato con un intervallo di 30 minuti l'uno dall'altro e l'esperimento è stato condotto in modalità over-night. Il giorno successivo, terminati i 20 cicli, sono state pesate nuovamente le 8 eppendorf aspettandoci di trovare un peso teorico maggiorato di 100 mg (100 μ l) rispetto a quello iniziale. I risultati ottenuti sono riportati nella Figura 3.1.

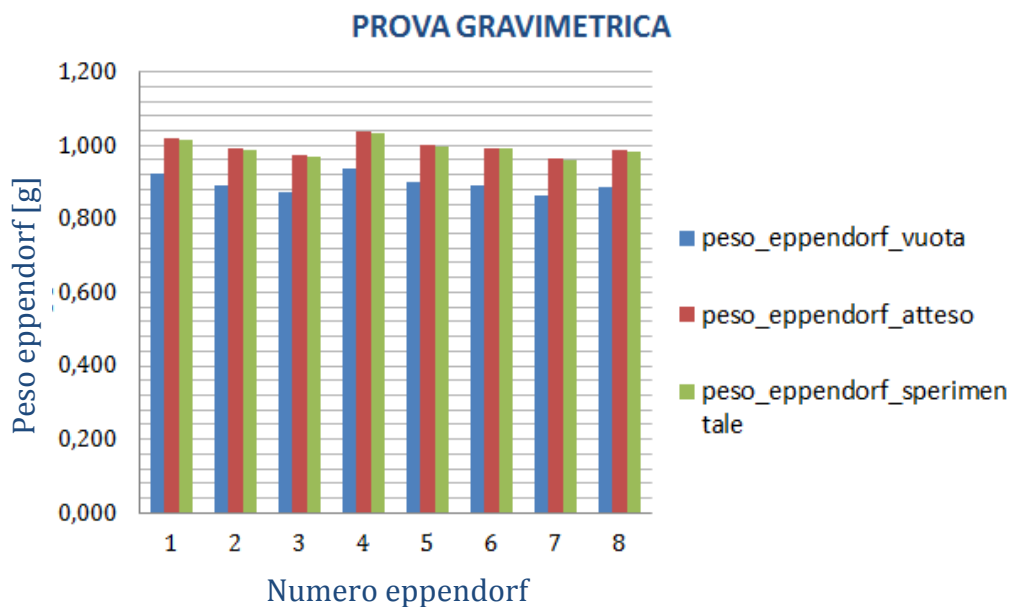


Figura 3.1: Prova gravimetrica per la calibrazione degli 8 canali della pompa.

Si è quindi stimato un errore percentuale per ogni canale, mediante la formula (1):

$$err(\%) = \left| \frac{val.misurato - val.atteso}{val.atteso} \right| * 100 \quad (1)$$

In particolare l'errore presenta un range di variabilità nell'intervallo [2%÷8%], con un errore medio pari al 5%.

Volendo escludere tra le cause di tale discostamento il contributo dell'evaporazione durante la notte, si sono prese altre due eppendorf, riempite ciascuna con 100 μ L di acqua distillata, pesate ad un tempo $t=0$ e misurate nuovamente dopo 20 ore ($t=20$ h). Al tempo $t=0$ le due eppendorf pesavano 1.037 g la prima e 0.993 g la seconda. Al tempo $t=20$ h, si è registrato un peso rispettivamente di 1.035 g e 0.989 g, come illustrato in figura 3.2.

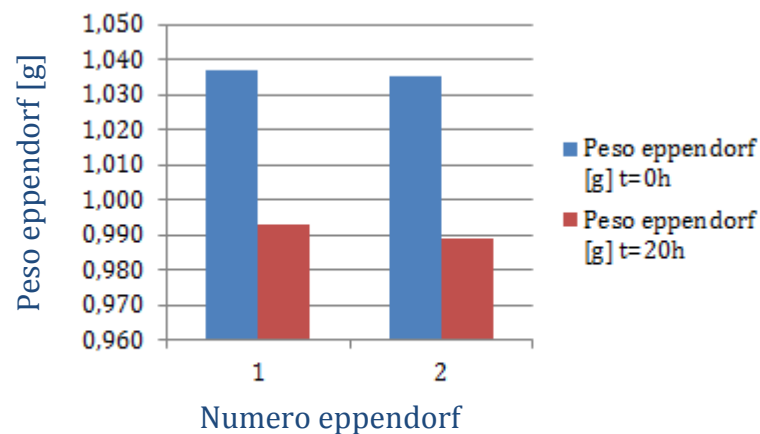


Figura 3.2: Valutazione dell'evaporazione nelle eppendorf in un intervallo di 20 ore.

Dunque, questa prova ha validato l'ipotesi precedente, in quanto, dopo 20 ore, si è verificata un'evaporazione media di 3 μ L.

3.1.1.2 Analisi delle prestazioni fluidodinamiche della pompa Cavro mediante analisi di immagini

Le prestazioni fluidodinamiche del sistema di movimentazione esterno sono state studiate anche con l'ausilio dell'analisi di immagini. La tecnica impiegata è quella comunemente conosciuta come *particle tracking*; si tratta di un metodo

ottico di misura globale del campo di moto di un fluido, che fornisce, in una determinata sezione del flusso, la proiezione del campo del vettore velocità istantanea sulla sezione stessa.

I punti critici di questa tecnica sono principalmente due: la concentrazione delle micro particelle inserite nel fluido (concentrazioni basse non consentono una descrizione esauriente del campo di moto, viceversa concentrazioni troppo elevate rendono difficile l'identificazione delle particelle nelle immagini) e la scelta dell'intervallo temporale tra un frame e l'altro (un intervallo troppo lungo può comportare il mancato riconoscimento di diverse particelle rendendole come appartenenti alla stessa traiettoria, viceversa intervalli troppo brevi comportano uno spostamento troppo piccolo delle beads e quindi la presenza di disturbi dovuti al rumore).

La procedura generale si articola nei seguenti punti:

1. inserimento di microparticelle nel flusso;
2. acquisizione delle immagini tramite stereomicroscopio;
3. implementazione di un software per il *tracking* delle particelle;
4. elaborazione dei dati.

Nello specifico, si è utilizzato un chip microfluidico a 5 canali (dimensioni canali: lunghezza 18 mm, larghezza 1.5 mm, profondità 0.2 mm), una concentrazione di beads (diametro di 10 μm) pari a $6\div 8 \mu\text{l}$, impostando una portata teorica di 2.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ ed un intervallo di acquisizione pari a 56 ms ($\approx 17.82 \text{ fps}$).

Una volta scelti i parametri di lavoro, la pompa è stata connessa al chip tramite tubi di tygon (diametro interno: 0.51 mm, diametro esterno: 1.52 mm) riempiti di acqua distillata.

Il software elaborato in linguaggio Matlab, permette di determinare le traiettorie delle particelle a partire dalle coordinate delle medesime nei diversi frame acquisiti; può essere schematizzato in 4 steps:

1. Individuazione della posizione delle singole beads e calcolo delle coordinate spaziali del centroide (Figura 3.3);

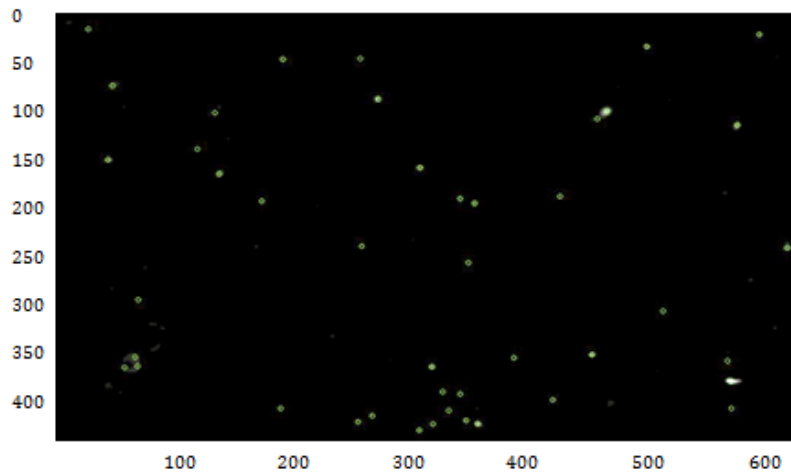


Figura 3.3: Individuazione delle beads.

2. Ripetere la procedura per il numero di frame stabilito;
3. Tramite opportune funzioni di autocorrelazione, decidere quali particelle appartengono alla medesima traiettoria e quali escludere dall'analisi, in quanto considerate rumore (Figura3.4);

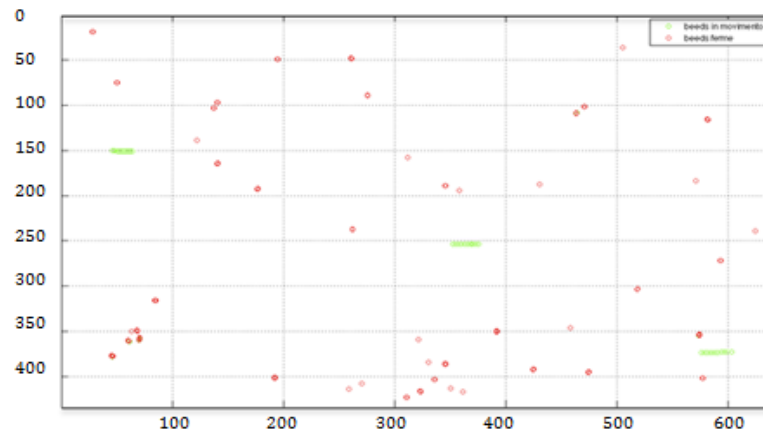


Figura 3.4: Classificazione delle beads (in rosso le beads ferme ed in verde le beads in movimento).

4. Determinare la velocità delle particelle tracciate.

Il comportamento della pompa è stato studiato in normali operazioni di refill ed a seguito di sollecitazioni meccaniche (cambio testata, start/stop, stop/start), per verificare se le perturbazioni introdotte da tale sistema di movimentazione fluidica possano inficiare lo stato fisiologico delle colture cellulari.

In particolare, per le operazioni di refill sono state monitorate le posizioni di 20 beads in un canale microfluidico per un tempo totale pari a $\Delta t = 560$ ms (≈ 10 frame) sull'intera sezione, come mostra la Figura 3.5.

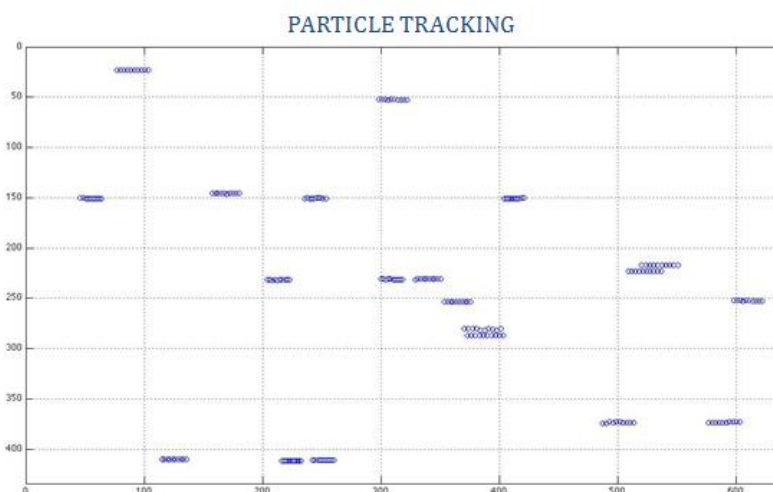


Figura 3.5: Traiettorie delle beads sull'intera sezione del canale.

La velocità risulta quindi dal rapporto tra lo spazio percorso dalle singole particelle e il tempo impiegato a percorrerlo. La Figura 3.6 mostra i valori di velocità delle 20 particelle monitorate, che presentano un range di variabilità nell'intervallo $[0.123 \div 0.221]$ mm/s; il valor medio è quindi uguale 0.1634 ± 0.03 mm/s che risulta essere conforme al valore teorico impostato dalla pompa, pari a 0.138 mm/s.

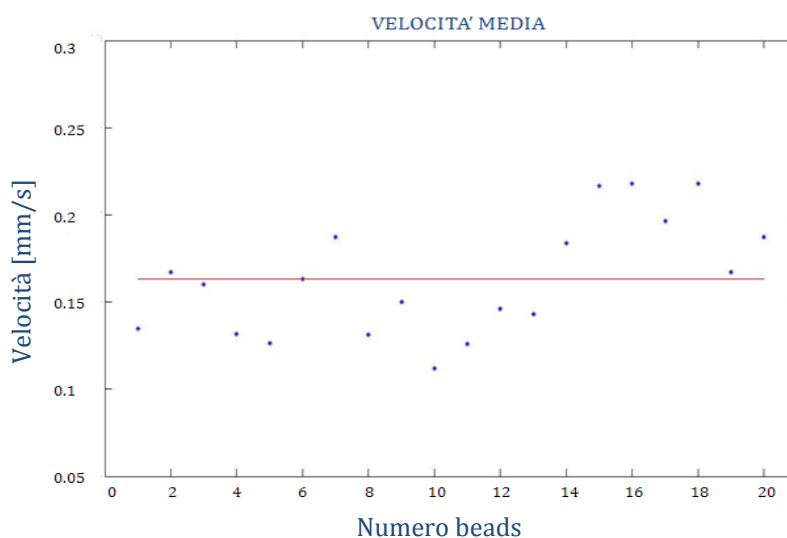


Figura 3.6: Velocità delle singole beads e velocità media (linea rossa).

E' stata quindi calcolata la portata come il prodotto tra la velocità media e l'area della sezione del condotto, ottenendo un valor medio pari a $2.94 \pm 0.59 \mu\text{L}/\text{min}$, anche questo conforme alla portata teorica fornita dalla pompa, pari a $2,5 \mu\text{L}/\text{min}$. Successivamente, per validare le prestazioni della pompa a siringa in microfluidica sono state condotte delle prove sperimentali per valutare gli effetti delle sollecitazioni meccaniche dovute alle vibrazioni dei due motori stepper presenti nella pompa. Tale sistema di movimentazione fluidica permette di gestire le operazioni di refill ed infuse comandando un canale per volta E' neccassario quindi accertarsi quanto queste perturbazioni possano compromettere lo stato di salute della coltura cellulare; anche in questo caso l'analisi è stata condotta tramite *particle tracking*.

Sono state studiate 3 principali sollecitazioni meccaniche:

1. Cambio testata

Il sistema di movimentazione fluidica della pompa cattro permette di gestire le operazioni di refill ed infuse comandando un canale per volta, quindi si è voluto valutare quanto le vibrazioni emesse dal motore che comanda il cambio valvola potessero alterare le condizioni di lavoro e di contorno.

La Figura 3.7 mostra lo spostamento che subisce una particella in flusso a seguito del cambio testata, sapendo che in verde è indicata la posizione iniziale e in blu le posizioni negli istanti successivi, fino al completo arresto.

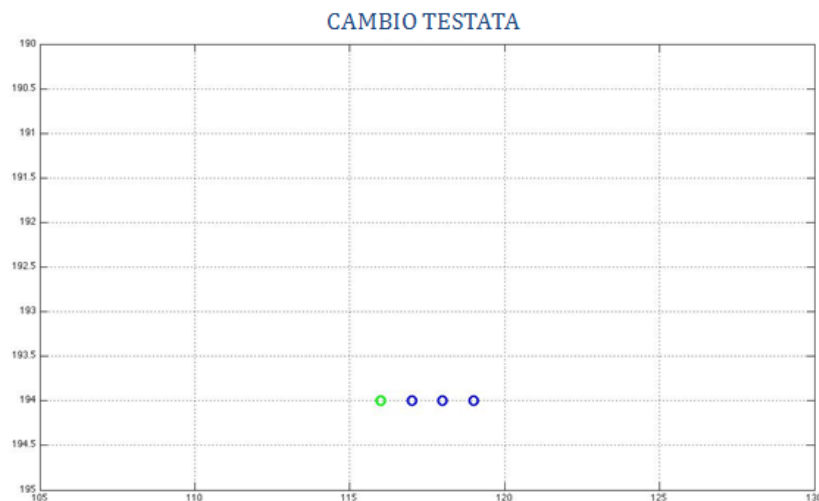


Figura 3.7: Scostamento della bead, da una posizione iniziale di riposo, causato da un cambio testata della pompa.

Il grafico mostrato in Figura 3.8 mostra l'andamento nel tempo dello spostamento delle beads, durante uno switch tra valvole, registrando uno spostamento medio pari a $10,50 \pm 0,01 \mu\text{m}$ in circa 170 ms.

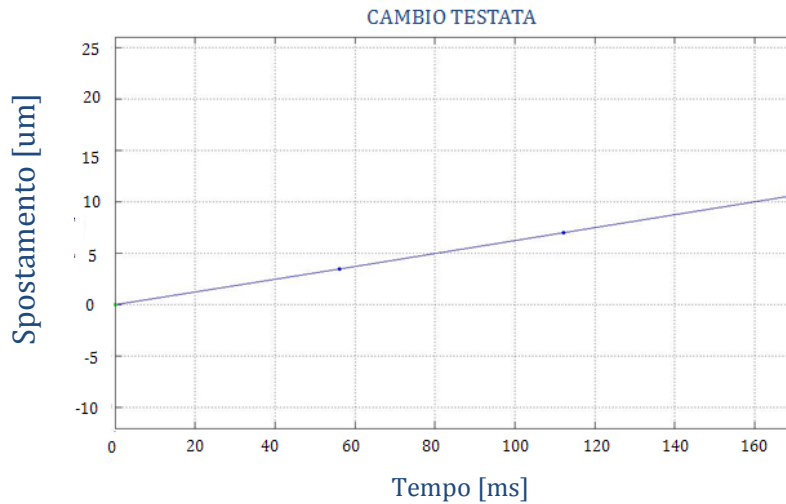


Figura 3.8: Andamento dello spostamento del flusso nel tempo durante uno switch tra valvole.

2. Start/Stop

Un altro aspetto critico è rappresentato dalle condizioni di start-stop, ovvero quando la pompa si arresta. Questa condizione si verifica spesso visto che la coltura cellulare in microfluidica viene sempre monitorata da cambi medium e da iniezione di nutrienti che avvengono con una frequenza temporale ben precisa.

La figura 3.9 mostra lo spazio percorso dalla particella prima di arrestarsi, sapendo che in blu è indicata la posizione negli istanti precedenti all'arresto della pompa, in verde la posizione all'istante dell'arresto ed in rosso gli istanti in cui la bead si muove di moto inerziale prima di arrestarsi.

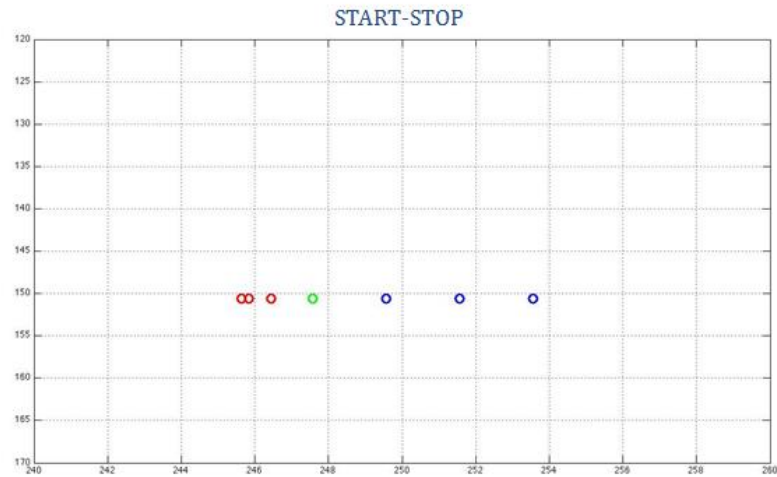


Figura 3.9: Comportamento fluidodinamico delle beads in condizione di start/stop.

Si vede quindi come il flusso non si arresta nell'istante in cui avviene lo spegnimento della pompa ma persiste un moto smorzato nel tempo, di circa $6.71 \mu\text{m}$ che si esaurisce in circa 170 ms, come mostra la Figura 3.10

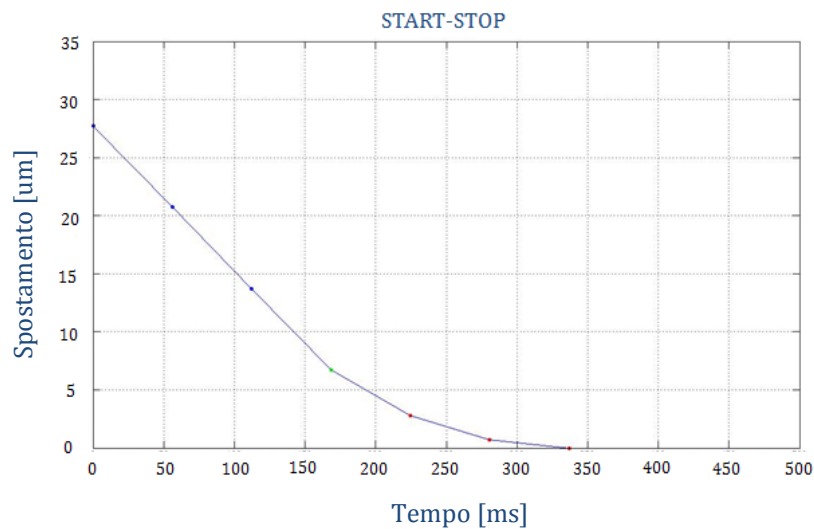


Figura 3.10: Comportamento fluidodinamico dello spostamento delle beads, in condizione start/stop.

3. Stop/Start

Considerazioni analoghe, è possibile farle anche nella situazione opposta (stop-start); ovvero, nel caso in cui avviene l'inizio di un infuse/refill. In questo caso, nel momento istantaneo in cui ha inizio il refill, si osserva un piccolo spostamento iniziale della beat in un verso opposto (ma nella stessa direzione) da quello atteso,

come mostrato in figura 3.11 dai puntini rossi, per poi procedere nel verso corretto (puntini in blu):

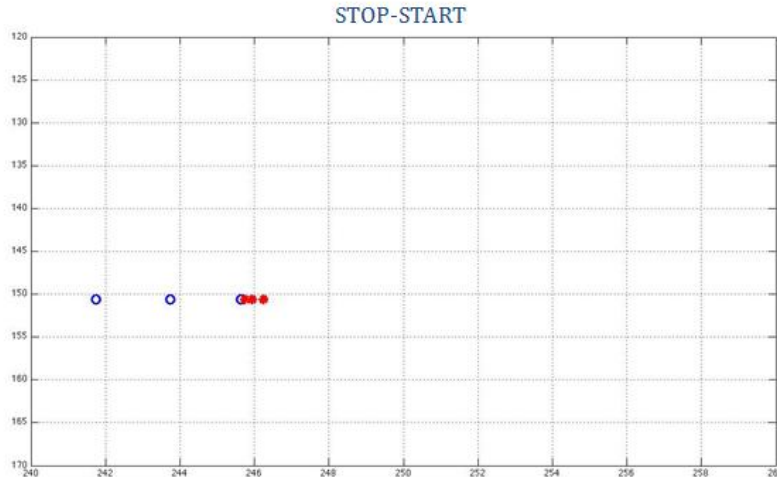


Figura 3.11: Comportamento fluidodinamico delle beads all'inizio di un infuse/refill.

Questo spostamento è pari a $2.04 \mu\text{m}$, percorso in un tempo poco superiore a 150 ms. Anche in questo caso, per una maggiore chiarezza dei risultati, viene mostrato in figura 3.12, l'andamento dello spostamento [μm] in funzione del tempo [ms], dove la parte positiva del grafico rappresenta lo spostamento dei puntini rossi mentre, la parte negativa, il moto corretto indicato dai puntini in blu di figura 3.11:

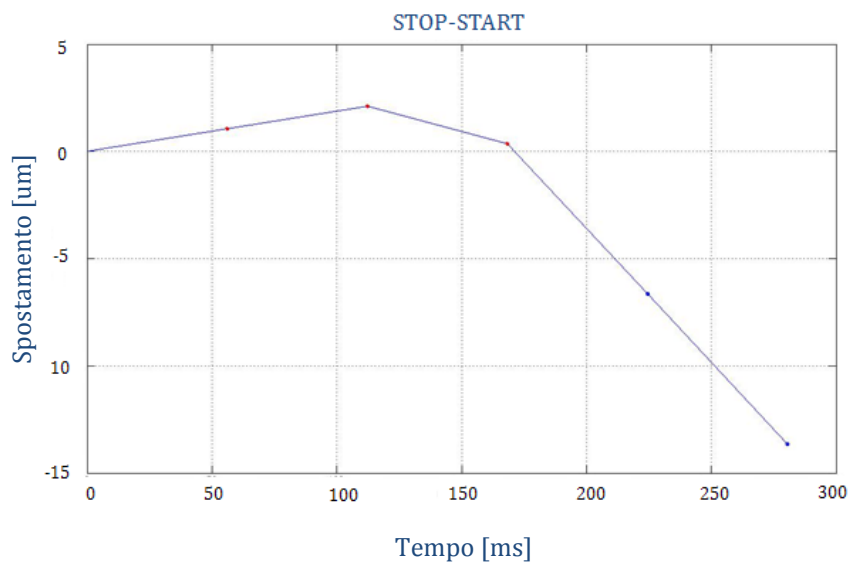


Figura 3.12: Andamento dello spostamento delle beads, in relazione al tempo, nel caso di inizio refill.

Dalle indagini condotte sia in normali condizioni di refill e di infuse che di condizioni di lavoro caratterizzate dalla presenza di sollecitazioni meccaniche, è emerso che le pompe della TECAN risultano essere dei buoni strumenti per la movimentazione fluidica esterna; anche le condizioni più critiche legate alla presenza di sollecitazioni meccaniche sono tollerabili dal momento che lo *shear stress* che riescono a sopportare le cellule è dell'ordine di 1 Pa.

3.1.2 Sistema *liquid-handling* integrato on a chip

Il sistema liquid-handling integrato *on a chip*, è realizzato mediante tre micro valvole allineate parallelamente e distanziate tra di loro poche centinaia di micron. Controllando le micro valvole, in modo tale che eseguino dei cicli di chiusura e di apertura predefiniti, è possibile ricreare il moto caratteristico di un pompaggio peristaltico. La sequenza utilizzata per realizzare la peristalsi è 101, 100, 110,010,011,001, dove “0” e “1” indicano rispettivamente “valvola aperta” e “valvola chiusa” [Marc A. Unger et al., 2000].

La differenza sostanziale tra questa tecnica ed una effettiva pompa peristaltica, è che quest'ultima si basa su un sistema meccanico mentre la prima attua la movimentazione fluidica mediante compressione delle micro valvole.

3.1.2.1 Studio del comportamento fluidodinamico mediante analisi di immagini

Gli obiettivi di questo studio sono:

- Valutare la portata della pompa peristaltica, in relazione alla frequenza con cui è realizzato il ciclo peristaltico.

Le dimensioni del chip utilizzato e le sue pressioni di esercizio sono riportati in tabella 3.1:

Larghezza canali serpentina [μm]	100
h canali [μm]	50
D camera [μm]	3000
V camera [nL]	1200
Dimensioni pompa peristaltica (fl x cl x h) [μm^3]	170x130x30
pressione lato <i>flow</i> [psi]	10
pressione lato <i>control</i> [psi]	30

Tabella 3.1: Caratteristiche del chip utilizzato.

Per analizzare il moto del fluido, si sono inserite all'interno del canale microfluidico delle beads (≈ 10 micron) ed, attraverso l'ausilio di una telecamera montata su stereomicroscopio, è stato monitorato il loro movimento nel tempo, impostando diverse frequenze di azionamento. Le immagini sono state analizzate grazie al programma del *particle tracking*, sviluppato in MATLAB, il quale calcola la velocità media di tutte le *beeds* in movimento nel video.

Dunque, conoscendo la velocità e la sezione del canale, è stato possibile calcolare la portata a diverse frequenze di attivazione delle micro valvole.

In figura 3.13, vengono riportate una serie di immagini, acquisite al microscopio, rappresentative il moto peristaltico nel canale di una piattaforma microfluidica, realizzato grazie all'apertura ed alla chiusura sincronizzata ed automatica delle micro valvole pneumatiche.

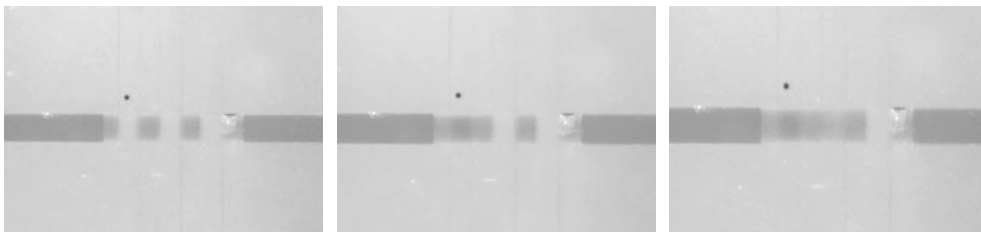


Figura 3.13: Immagini acquisite al microscopio rappresentanti il pompaggio peristaltico.

I risultati, che mostrano l'andamento della portata generata dalla pompa [nL/min] in funzione della frequenza [Hz] di apertura delle elettrovalvole, sono sintetizzati in figura 3.14:

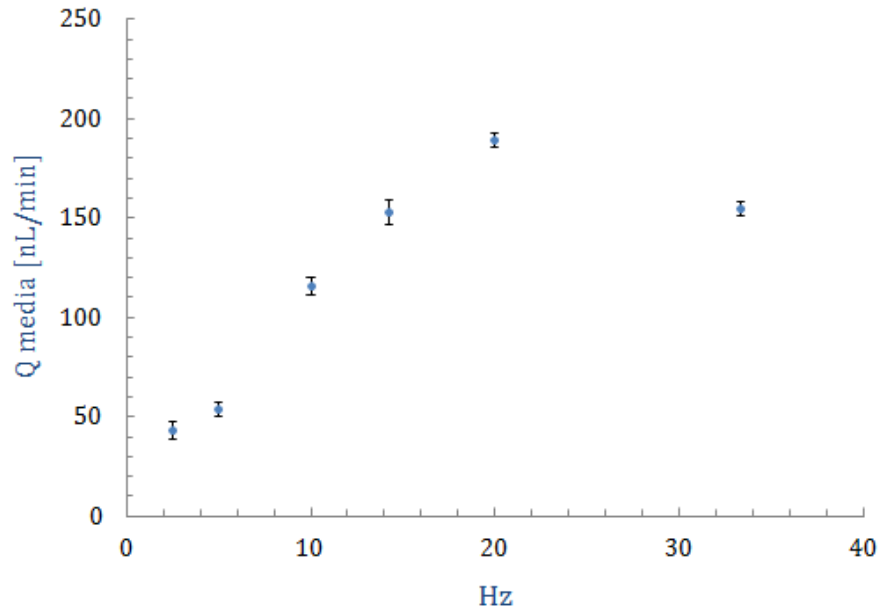


Figura 3.14: Portata della pompa peristaltica a varie frequenze di apertura dell'elettrovalvole.

Dal grafico, è possibile notare come la relazione tra portata e frequenza di attivazione delle micro valvole, non è proporzionale. Infatti, si verifica una portata massima in prossimità di una frequenza di 20 Hz, oltre la quale si assiste ad una sua diminuzione.

Dunque, la pompa peristaltica è in grado di lavorare in un range di portate che va da un valore minimo di appena 50 nL/min, fino ad arrivare ad un valore massimo di circa 200 nL/min. La scelta della frequenza di lavoro, alla quale è associata una specifica portata, viene scelta di volta in volta in base alle condizioni di lavoro richieste dall'esperimento.

3.2 Studio e validazione dell'incubatore *on the bench*

In questo paragrafo, verranno riportati tutti gli esperimenti condotti al fine di validare l'efficacia e la funzionalità dell'incubatore *on the bench* per colture cellulari, partendo da prove preliminari su semplici terreni di coltura fino ad arrivare ad esperimenti su colture cellulari on a chip.

3.2.1 Analisi preliminare su terreni cellulari per C2C12

Le prime prove sperimentali per validare le prestazioni dell'incubatore on the bench sono state fatte allo scopo di valutare i seguenti punti:

- Misura del pH
- Concentrazione di glucosio
- Evaporazione

Per questo studio, si è utilizzando una multiwell da 48 pozzetti, PBS (soluzione tampone che funge da buffer salino per mantenere la stessa pressione osmotica) posizionato attorno ai pozzetti della multiwell ed, infine, il terreno per una linea cellulare muscolare murina (cellule C2C12). Il tutto è stato eseguito ad una temperatura di 37 °C.

I risultati relativi alla misura del PH, in relazione alla temperatura dell'incubatore on the bench, rappresentati in Figura 3.15, mostrano come a partire da una situazione iniziale in cui il PH del terreno di coltura è pari a 6, dopo circa 23 ore risulta essere al valore desiderato, cioè 7,8.

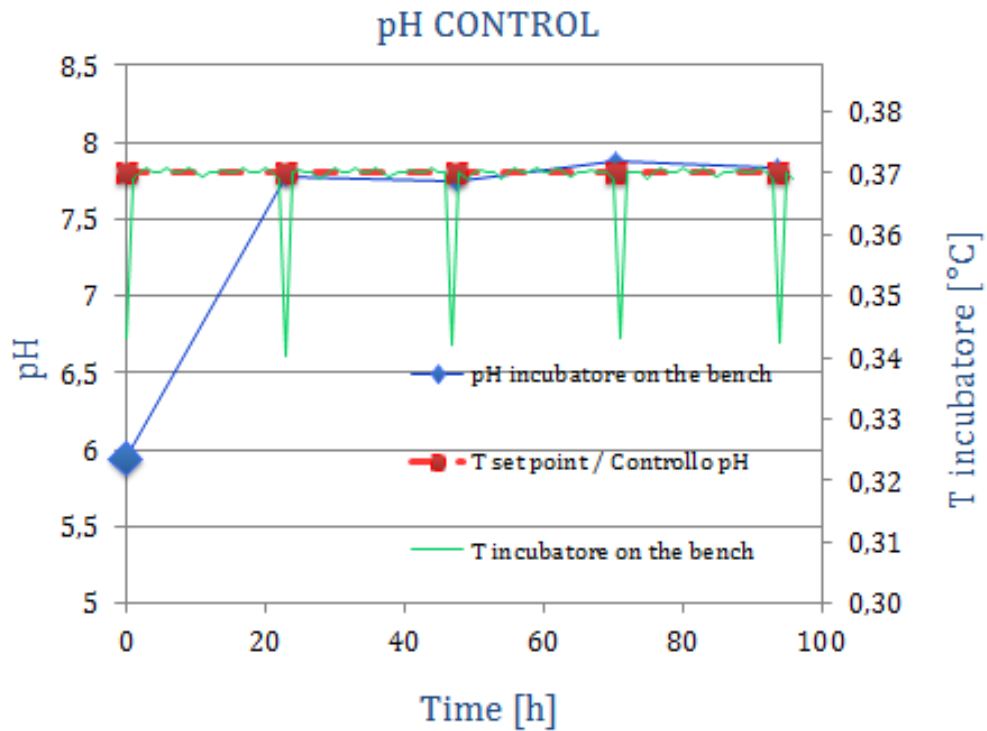


Figura 3.15: Controllo del pH per 4 time point.

Il fatto che la misura del PH nell'incubatore on the bench sia la stessa di quella attesa, valida l'analisi condotta, Inoltre è possibile osservare come, durante la misurazione del PH, la temperatura dell'incubatore, a seguito dell'apertura dello stesso, subisce una diminuzione di circa 3 °C (34 °C) per un tempo di circa 5 minuti prima di riportarsi alla temperatura desiderata di 37 °C.

Per valutare l'indice di evaporazione è stata invece monitorata la concentrazione di glucosio contenuta nel terreno nel tempo.

Il grafico 3.16 ottenuto, relativo alla concentrazione di glucosio [mg/dL] nel tempo [h], è il seguente

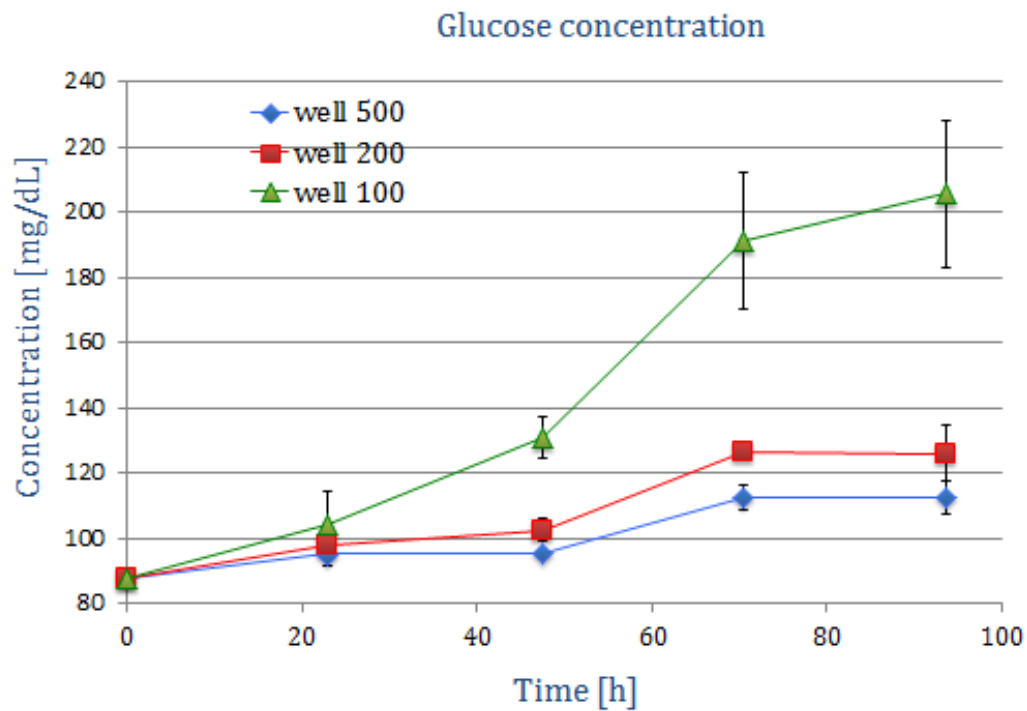


Figura 3.16: Andamento della concentrazione di glucosio nel tempo.

Come mostrato in figura, si registra un lieve aumento della concentrazione con il trascorrere delle ore (4 giorni), eccetto che nella multiwell da 100ul.

A partire dal grafico 3.16, è possibile ricavare, di conseguenza, l'andamento dell'evaporazione [%] nel tempo [h], come mostrato in figura 3.17:

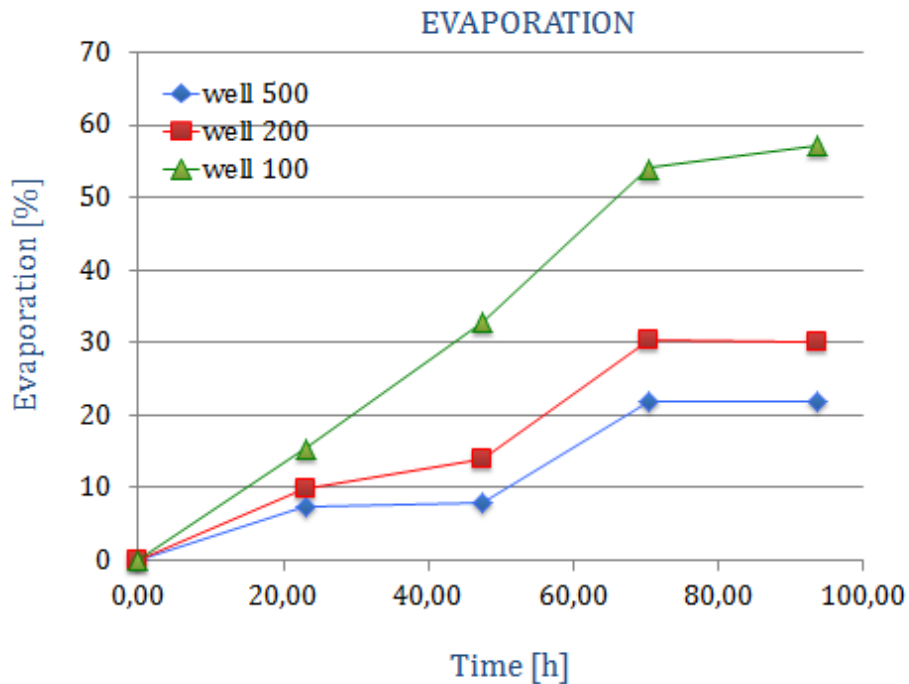


Figura 3.17: Andamento dell'evaporazione nel tempo.

Come si evince dal grafico 3.17, il grafico relativo alle well da 200 μl , registra un'evaporazione di circa il 30% (e poco più del 20% nelle well da 500 μl) dopo quasi 4 giorni. Considerando che, negli esperimenti di colture cellulari on a chip, si ha mediamente un cambio medium ogni 6 h, questo risultato è molto positivo.

3.2.2 Analisi di colture cellulari on a chip in statica

Dopo aver condotto delle analisi preliminari (ottenendo dei risultati positivi), sono stati eseguiti esperimenti su colture cellulari on a chip in condizione statiche, ovvero senza l'utilizzo di alcun sistema liquid-handling.

L'esperimento è stato suddiviso in diversi time point e, per ciascuno di esso, l'obiettivo era:

- Eseguire il conteggio delle cellule.
- Valutare il rapporto cellulare live & dead.
- Valutare la proliferazione cellulare.

Queste analisi sono state condotte sia per l'incubatore *on the bench* (sviluppato durante il lavoro di tesi) che per l'incubatore classico, al fine di poter effettuare un confronto delle prestazioni.

Per condurre questo esperimento, si sono utilizzate petri da 3.5 cm di diametro. In ogni petri sono state deposte 15000 cellule C2C12, diluite in 19.5 ul nella soluzione delle cellule. Come terreno si è utilizzato dMEM + 10% FBS + 1% pen strep, in volume pari a 1.5 ml. Il tutto è stato eseguito ad una temperatura di 37 °C, con il 5% di CO₂ e l'umidità pari al 95%. La prova sperimentale ha avuto durata di 4 giorni ed è stata analizzata in tre 3 time point diversi; dunque in totale, per valutare tutte le condizioni sopra citate (sia per l'incubatore *on the bench* che per l'incubatore classico), è stato necessario lavorare con 18 petri.

Inoltre, per ogni time point, si sono andate ad acquisire delle immagini al microscopio. Nel dettaglio, si sono acquisite immagini rappresentanti la morfologia, immagini per visualizzare e contare i nuclei i quali, utilizzando l'HOECST, fluiscono nel blu, immagini per visualizzare e contare le cellule vive le quali,utilizzando la calceina, fluiscono nel verde, immagini per visualizzare e contare le cellule morte che, mediante etidio bromuro, fluiscono nel rosso ed, infine, immagini per evidenziare le cellule proliferanti le quali, utilizzando il Brdu, fluiscono nel verde. Queste immagini, sono state successivamente analizzate attraverso un programma sviluppato con il linguaggio MATLAB.

Nella figura 3.18 seguente, si riporta un esempio della tipologia delle immagini acquisite:

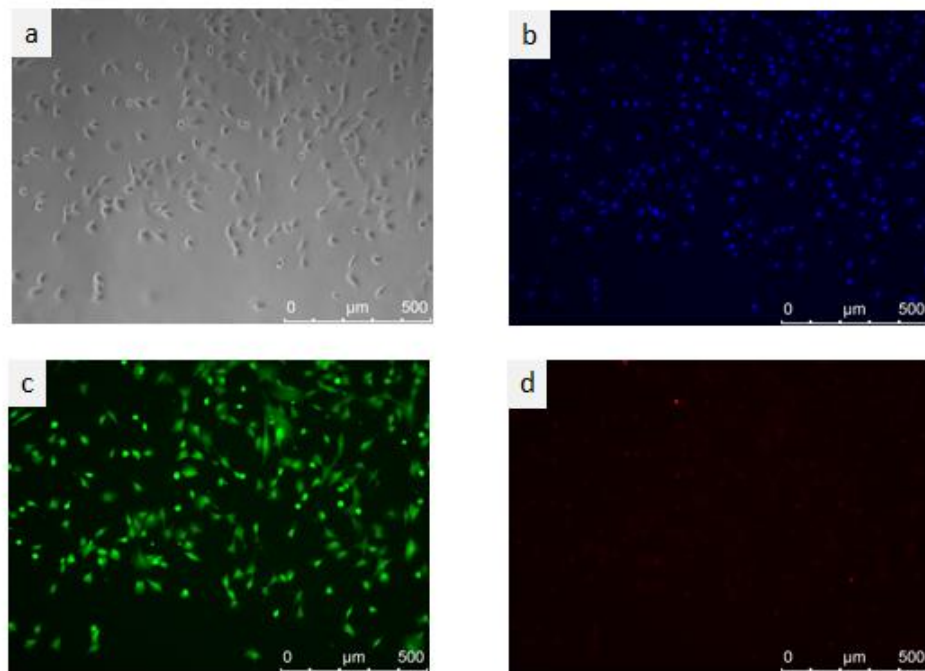


Figura 3.18: Immagini acquisite al microscopio: a) morfologia cellulare; b) nuclei cellulari; c) cellule vive; d) cellule morte.

I risultati al primo time point, hanno registrato un numero di cellule molto superiore nella petri dell'incubatore classico (82700 cellule) rispetto a quelle presenti nella petri dell'incubatore on the bench (48000 cellule), un rapporto live & dead pressochè simile (per entrambi circa il 90% delle cellule è risultato vivo) ed una percentuale di cellule proliferanti in ambedue gli incubatori intorno al 50%.

Per quanto riguarda il secondo time point, si è registrata nuovamente una differenza sostanziale fra il numero di cellule presenti nella petri dell'incubatore classico (126700 cellule) rispetto a quelle nella petri dell'incubatore on the bench (86700 cellule). Ancora una volta, in entrambi i sistemi, si è registrato un numero di cellule vive superiore al 90% ed un numero di cellule proliferanti intorno al 50%.

Infine, per quanto concerne il terzo, ed ultimo, time point (t2: giovedì 24/05/12 h15:30) si è misurata una differenza ancora più accentuata nel numero di cellule tra l'incubatore classico (547000 cellule) e l'incubatore on the bench (167000 cellule). Riguardo il numero di cellule vive e proliferanti, si sono ottenuti,

nuovamente, dei risultati del tutto analoghi a quelli riscontrati nei due time point precedenti.

In Figura 3.19, vengono schematizzati e riportati in dettaglio i risultati sopra descritti riguardo al rapporto delle cellule vive e delle cellule morte

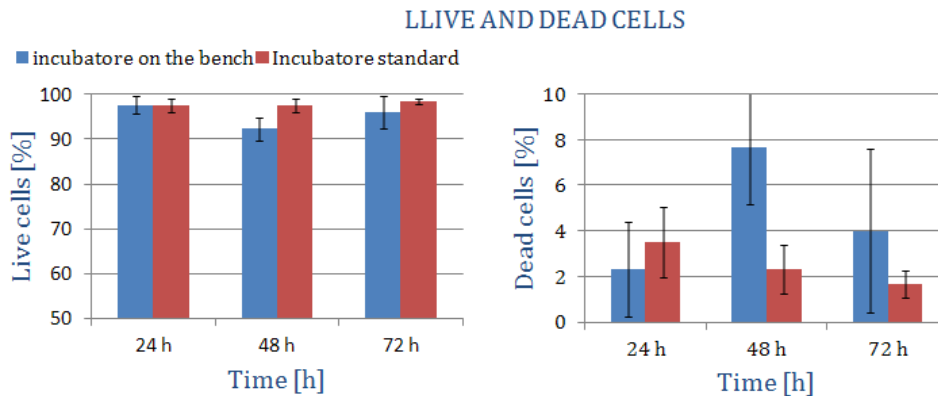


Figura 19: Statistica delle cellule vive e morte

Mentre in figura 3.20 si riporta il grafico che rappresenta la percentuale di cellule proliferanti nei 3 time point:

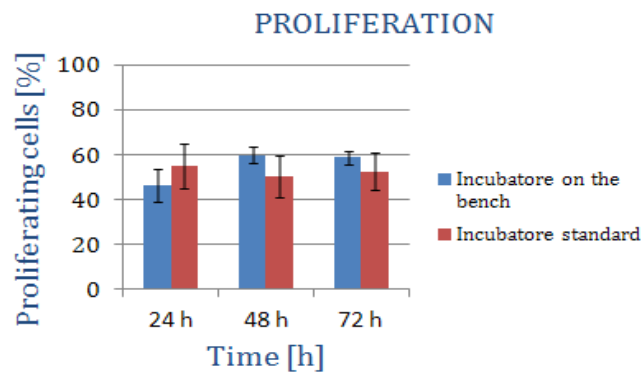


Figura 3.20: Statistica delle cellule proliferanti.

Una risposta plausibile alla differenza registrata tra i due sistemi, nel conteggio cellulare, è data dal fatto che in realtà, in prossimità della petri dell'incubatore on the bench, la temperatura era pari a 36 °C e non 37 °C. Questa differenza di un grado può, dunque, alterare notevolmente le condizioni ideali per la crescita delle colture cellulari. Il problema principale, è stato il luogo in cui si è deciso di

posizionare il sensore per rilevare la temperatura; infatti, essendo il sistema di dimensioni relativamente piccole, al suo interno si ha un elevato gradiente di temperatura. Si pensa, dunque, di risolvere il problema posizionando il sensore in prossimità della petri, e non più nel mezzo dell'incubatore.

3.2.3 Applicazione del sistema ad una *long-term culture*

Come ultimo step, è stato eseguito un esperimento per valutare le prestazioni dell'incubatore *on the bench* applicato ad una *long-term-culture* di mioblasti murini.

Questa analisi ha come obiettivo il verificare che tutti i parametri richiesti per la crescita ed il differenziamento cellulare, ovvero:

- Temperatura = 37 °C
- CO₂ = 5%
- Umidità = 95%
- Cambio medium, mediante il sistema *liquid-handling* esterno, ogni 6 ore in fase di proliferazione ed ogni 24 ore nello stadio di differenziamento

siano stati soddisfatti e, contemporaneamente, controllati in modo continuo ed automatico nel tempo. Come indice di valutazione sono state acquisite delle immagini al microscopio, in diversi istanti temporali, ed analizzate per verificare il differenziamento cellulare e, dunque, la formazione di miotubi.

Sono state seminate circa 200 cells/mm², come mostrato in figura 3.21:

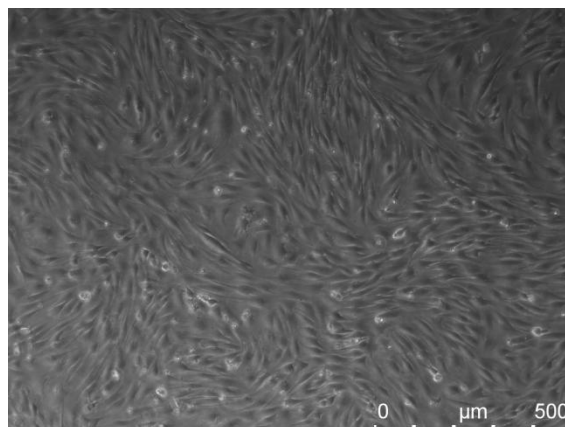


Figura 3.21: Morfologia delle cellule C2CC12 dopo 24 ore la semina.

Dopo sette giorni si è osservata la differenziazione cellulare, come mostrato dalla morfologia delle cellule di figura 3.22:

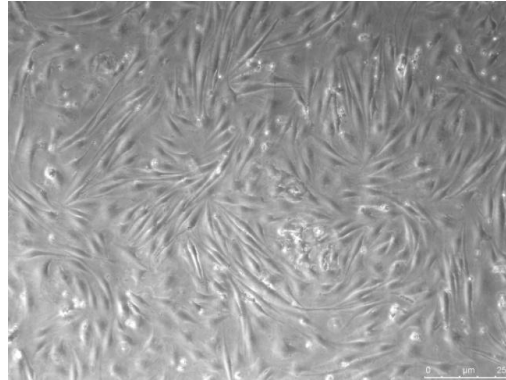


Figura 3.22: Differenziazione cellulare, osservata al settimo giorno.

Particolarmente interessante, risulta osservare come le cellule evolvono nei 5 giorni successivi il differenziamento; è facile notare come, all'aumentare dei giorni, la presenza dei miotubi diventa sempre più netta e marcata (figura 3.23).

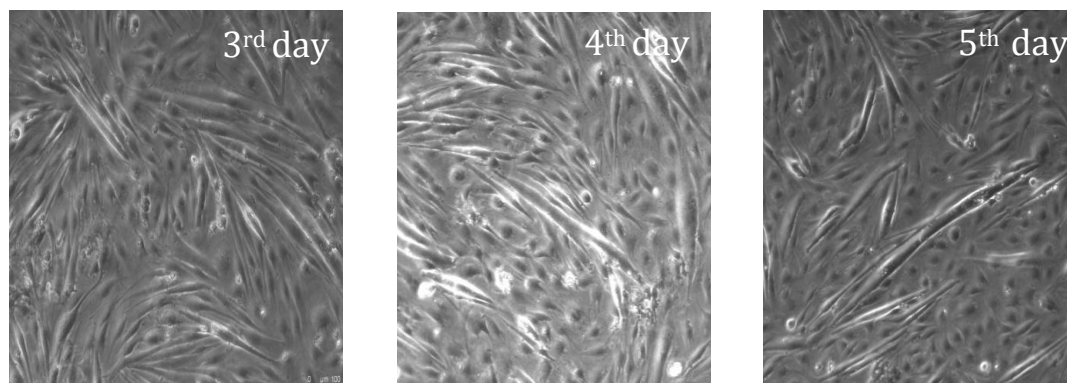


Figura 3.23: Evoluzione nel tempo della differenziazione cellulare.

Come ulteriore verifica, per evidenziare meglio la proliferazione cellulare, sono state effettuate analisi di immunofluorescenza contro la miosina. La presenza di quest'ultima viene visualizzata mediante una fluorescenza verde (figura 3.24).

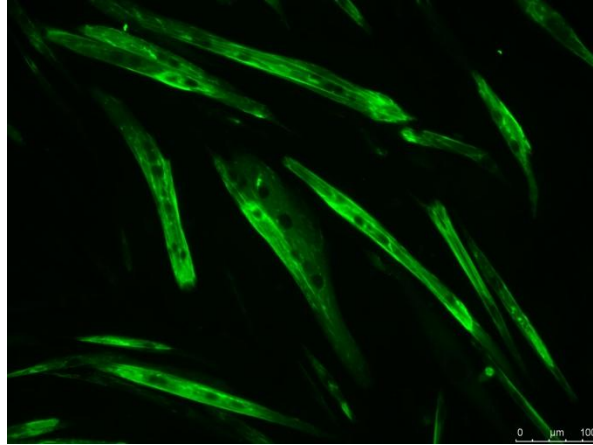


Figura 3.24: Analisi di immunofluorescenza per evidenziare i miotubi formati

CAPITOLO 4 - CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

4.1 Conclusioni

Questo lavoro di tesi risponde all'esigenza di mettere a punto una strumentazione *ad hoc* per eseguire esperimenti di coltura cellulare *on a chip*. In particolare è stato realizzato un incubatore *on the bench* che integri in maniera robusta tutti i sistemi di controllo necessari per la sopravvivenza cellulare. Il tutto si traduce in un ridotto ingombro spaziale e in un controllo selettivo delle condizioni al contorno di un determinato esperimento. La fase di sviluppo di tale dispositivo ha interessato sia la parte di progettazione che quella di fabbricazione, seguendo specifici criteri e vincoli strumentali.

Il mio personale contributo a questo lavoro è stato quello di gestire tutte le componenti della strumentazione necessarie per poter condurre esperimenti di coltura cellulari in microfluidica. Pertanto la strumentazione è stata dotata di opportuni controlli di temperatura, di umidità, di PH e di CO₂, requisiti fondamentali di un classico incubatore commerciale.

Avendo come obiettivo finale quello di condurre esperimenti di coltura cellulari su chip microfluidici, il dispositivo è stato integrato anche con opportuni sistemi di movimentazione fluidica. L'esigenza nasce dalla natura stessa di tale tecnologia, trattandosi di una disciplina che richiede un'elevata precisione, dovendo lavorare con piccoli volumi di fluido.

In particolare sono stati implementati due sistemi di *liquid handling*, uno esterno, che garantisce portate di fluido dell'ordine di decine di microlitri, ed uno integrato al chip, che assicura portate dell'ordine di centinaia di nanolitri. La diversità nasce dalla specifica applicazione e dai risultati che vogliono ottenersi da una sperimentazione. Le prestazioni di tali sistemi, valutate con l'ausilio di analisi d'immagini (*particle tracking*), si sono dimostrate conformi alle soglie massime di sollecitazioni alle quali possono essere sottoposte le cellule (*shear stress* dell'ordine di 1 Pa).

Una volta validate le performance dell'intera strumentazione, sono stati condotti esperimenti di coltura di cellule muscolari murine (C2C12) prima in statica e poi

in dinamica; i risultati, ampiamente descritti nel capitolo 3, appaiono incoraggianti in quanto la vitalità, nonché lo stato di salute delle cellule, risultano confrontabili con quelli ottenute in un classico incubatore commerciale.

4.2 Sviluppi futuri

Nel laboratorio presso cui ho sviluppato questa tesi di laurea, la strumentazione messa a punto in questo lavoro ha trovato già largo impiego in numerose applicazioni. In particolare è stata utilizzata per monitorare colture cellulari *long-term*. Sono stati, infatti, condotti esperimenti di differenziamento di mioblasti murini in miotubi, allo scopo di sviluppare dei modelli *in vitro* di muscolo scheletrico. Questo permetterà di condurre studi su malattie importanti come il diabete, mediante analisi di *drug stimulation*: ad esempio studiando la risposta del tessuto a stimolazioni insuliniche. I primi risultati incoraggiano l'applicazione di questa tecnologia in questo particolare campo, dando un valido contributo alla messa a punto di un protocollo sperimentale.

Dal punto di vista strettamente tecnologico, i prossimi obiettivi saranno quelli di integrare l'incubatore *on the bench* con micro telecamere (dalle dimensioni di qualche millimetro), in prossimità della zona adibita ad accogliere la piattaforma microfluidica. Questo consentirà l'analisi nel tempo, in modalità *real-time*, delle colture cellulari *on a chip* senza più la necessità di dover aprire l'incubatore e trasportare la piattaforma microfluidica al microscopio, con il rischio di alterare l'esperimento.

BIBLIOGRAFIA

<http://www.ni.com/support/> (ultima consultazione 1/07/2012).

Kim L., Toh Y., Voldman J., and Yu H. *A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells*, *Lab on a chip* 7: 681-694, 2007.

Meling Jessica and Quake Q. Stephen R., *Microfluidic Large-Scale Integration: The Evolution of Design Rules for Biological Automation*, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*,. 36:213-31, 2007.

Squires Todd M. and Quake Stephen R., *Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale*, *Reviews of modern physics*, Volume 77, July 2005.

Unger Marc A., Chou Hou-Pu, Thorsen Todd, Sherer Axel, Quake Stephen R., *Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography*, *Science*, Vol. 288, 7 April 2000.

Vozzi Giovanni, Flaim Christopher, Ahluwalia Arti, Bhatia Sangeeta, *Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition*, *Biomaterials* 24 (2003) 2533–2540, 20 January 2003.

Whitesides George M., *The origin and the future of microfluidics*, *Nature*, Vol. 442, 27 July 2006.

Xia Y. and Whitesides G.M., *Soft lithography*, *Ann. Rev. Mater. Sci.* 28:153-184, 1988.

Zhang X. et al, *Lab on a chip*, 561-566, 2006.