



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA IN INGEGNERIA DEI PROCESSI
INDUSTRIALI E DEI MATERIALI
(Laurea triennale DM 270/04 – Indirizzo Chimica)

**PROGETTAZIONE E SVILUPPO DI UN DISPOSITIVO
MICROFLUIDICO PER LA GENERAZIONE DI
GRADIENTI DI OSSIGENO IN COLTURE
CELLULARI**

Relatore: Ing. Nicola Elvassore

Correlatore: Ing. Alessandro Zambon

Laureanda: Martina Floriani

ANNO ACCADEMICO 2011- 2012

Riassunto

In questo lavoro di tesi si è progettato un dispositivo microfluidico capace di generare un gradiente della concentrazione di ossigeno stabile e duraturo nel tempo all'interno di una camera di coltura cellulare.

Durante la progettazione si è focalizzata l'attenzione sulla scelta di alcune variabili geometriche e operative che permettessero il raggiungimento dei limiti imposti al chip microfluidico. La progettazione del dispositivo è stata effettuata considerando la presenza di alcuni vincoli fissi come ad esempio le dimensioni della camera di coltura. Le variabili progettuali si sono determinate attraverso delle simulazioni computazionali, con lo scopo primario di ottimizzare lo scambio di ossigeno tra il sistema di generazione del gradiente e la camera di coltura.

Attraverso le simulazioni si sono valutate delle precise sezioni del dispositivo in geometria 2D e per ognuna di questa si è descritto il trasporto di materia e il trasporto di quantità di moto.

A conferma delle simulazioni teoriche sono state eseguite, infine, delle prove sperimentali per verificare l'effettiva formazione e durata nel tempo di un gradiente di concentrazione.

Indice

IINTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1 – Introduzione e stato dell’arte	3
1.1 GENERAZIONE DI GRADIENTI DI CONCENTRAZIONE IN MICROFLUIDICA	3
1.2. MICROFLUIDICA IN COLTURE CELLULARI	4
1.3. GENERAZIONE DI GRADIENTI DI CONCENTRAZIONE DI OSSIGENO	5
1.4. MOTIVAZIONI E SCOPO DELLA TESI	6
CAPITOLO 2 - Materiale e metodi	9
2.1. PROPRIETA’ DEL PDMS	9
2.2. SOFT-LITOGRAFIA.....	10
2.2.1.Creazione della geometria	10
2.2.2. Produzione del master in silicio.....	10
2.2.3. Produzione dello stampo in PDMS.....	13
2.2.4. Produzione dello strato sottile in PDMS.....	14
2.3. TECNICA DI ADESIONE A PIU’ STRATI.....	15
2.4. STRUMENTI PER IL CONTROLLO DELLA PORTATA IN FASE LIQUIDA	16
2.4.1. Pompa a siringa.....	16
2.4.2. Pompa peristaltica	18
2.4.2.1. Taratura della pompa peristaltica.....	19
2.5. SIMULAZIONI COMPUTAZIONALI.....	20
2.5.1. Assunzioni, parametri e analisi della soluzione	21

CAPITOLO 3 – Sviluppo del dispositivo e test funzionali	23
3.1. DESCRIZIONE GENERALE DEL SISTEMA.....	23
3.2. VALUTAZIONE DELLE VARIABILI GEOMETRICHE.....	24
3.2.1. Descrizione del sistema	24
3.2.2. Proprietà del sistema.....	26
3.2.3. Condizioni al contorno e iniziali.....	26
3.2.4. Analisi dei risultati.....	26
3.3. VALUTAZIONE DELLA VARIABILI OPERATIVE.....	29
3.3.1 Descrizione del sistema.....	30
3.4. CONDIZIONI DEL SISTEMA	32
3.4.1. Condizioni iniziali.....	32
3.4.2. Condizioni al contorno.....	32
3.5. ANALISI DEI RISULTATI.....	33
3.5.1. Verifica del mantenimento del gradiente tramite fluorescenza	38
CONCLUSIONI	43
APPENDICE A	45
APPENDICE B	47
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	49

Introduzione

Gli studi di colture cellulari *in vitro* necessitano di una corretta riproduzione dell'ambiente *in vivo*. L'ossigeno è uno dei parametri fondamentali per la vita cellulare, per questo motivo viene posto notevole interesse nel controllo della sua concentrazione nel microambiente in cui è mantenuta la coltura.

In questo lavoro di tesi è stato sviluppato un dispositivo con tecnologia microfluidica per la generazione di un gradiente di concentrazione di ossigeno all'interno della camera di coltura. Il chip microfluidico è prodotto tramite tecniche di soft litografia multistrato e sarà costituito da un sistema per la generazione di un gradiente e da una camera di coltura indipendente, separati da una membrana sottile di scambio.

Nel Capitolo 1, dopo una introduzione sui metodi microfluidici per la creazione di gradienti, sono elencate le motivazioni e lo scopo della tesi.

Nel Capitolo 2 si descrivono i materiali e metodi per la fabbricazione del dispositivo, l'esecuzione degli esperimenti e la realizzazione delle simulazioni computazionali.

Nel Capitolo 3 si riportano i risultati delle simulazioni teoriche, i quali hanno permesso di porre le basi per una corretta progettazione del chip microfluidico. La validazione sperimentale per verificare la reale presenza del gradiente è stata effettuata con traccianti colorati e fluorescenti.

Capitolo 1

Introduzione e stato dell'arte

1.1 Generazione di gradienti di concentrazione in microfluidica

La generazione di gradienti di specie chimiche trova largo impiego in campo biologico in quanto nei sistemi viventi l'ambiente cellulare è ricco di segnali chimico fisici che interagiscono con i sistemi viventi attraverso gradienti di concentrazione. Nel corso degli anni, con l'introduzione della tecnologia microfluidica, si sono evolute nuove tecniche che hanno permesso di generare gradienti microfluidici ed applicarli a ricerche biologiche (*Kim et al, 2010, Chung and Choo, 2010*).

Con l'introduzione della tecnologia microfluidica è stato possibile generare distribuzioni di specie stabili nello spazio e nel tempo. La generazione di gradienti con questa tecnica innovativa sfrutta l'assenza di fenomeni turbolenti e le peculiarità del moto laminare, che consente il controllo dei processi di trasporto diffusivo nella zona specifica di interesse. L'utilizzo di questa tecnologia permette di dar vita a gradienti stabili per una estensione micrometri fino ad alcuni centimetri. Il fluido all'interno dei canali raggiunge lo stato stazionario in pochi minuti.

Uno dei primi dispositivi proposti per la generazione di gradienti stabili e controllati nel tempo è quello proposto da *Jeon et al* nel 2000 e la sua evoluzione di *Dertinger et al* nel 2001. In questo caso la formazione di un gradiente di concentrazione all'interno di una camera microfluidica è ottenuta attraverso la presenza di nove canali di fluido a diverse concentrazioni che scorrono parallelamente. Le nove concentrazioni sono state ottenute mescolando in modo controllato tre soluzioni diverse provenienti da altrettanti ingressi indipendenti. Attraverso una rete di canali ad albero, ad elevata resistenza e lunghezza, il liquido viene suddiviso evitando percorsi preferenziali. A causa della notevole lunghezza della rete, il fluido riesce a diffondere lungo ogni canale ed è possibile ottenere, di conseguenza, una concentrazione uniforme all'uscita di ogni ramo. In Figura 1.1 viene riportata una riproduzione della geometria dei canali utilizzata nel lavoro descritto.

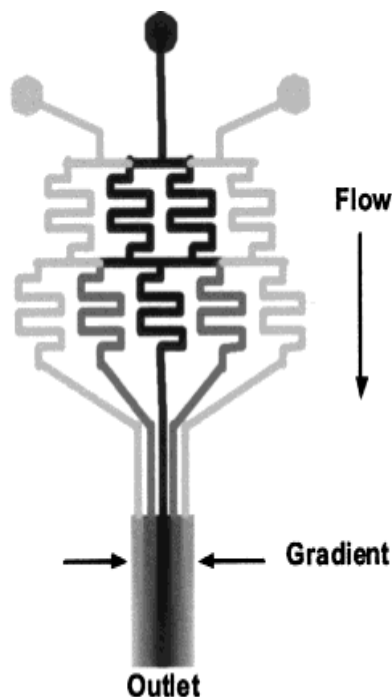


Figura 1.1. Rappresentazione schematica di una rete di canali microfluidici per generare gradienti.

In entrambi i lavori è stato dimostrato come la velocità di flusso influenzi pesantemente l'omogeneità del gradiente e la sua intensità. La regola che descrive il grado di miscelazione delle varie soluzioni dipende dai “*branching point*” nella rete piramidale dei canali, cioè i punti di diramazione. Il grado di miscelazione delle varie sostanze dipende dal numero di diramazioni ripetute: più aumentano più aumenta il numero delle concentrazioni ottenibili.

1.2 Microfluidica in colture cellulari

La microfluidica permette di mimare con buona approssimazione il microambiente che caratterizza le cellule *in vivo*. Grazie alla piccola scala la quantità di reagenti e di sostanze di rifiuto diminuisce notevolmente, i tempi di reazione sono minori e diventano possibili più operazioni in parallelo (Beebe *et al*, 2002). La microfluidica permette il controllo di volumi di fluido dell'ordine dei nanolitri e di flussi di concentrazione che non sarebbero possibili con altri metodi tradizionali (Walker *et al*, 2004).

I dispositivi microfluidici permettono un controllo del trasporto di materia con rispetto dei fenomeni chimici e fisici, e consentono perciò una riproduzione più fedele delle condizioni *in vivo*. Il rapporto superficie-volume aumenta di molto nei sistemi microfluidici consentendo di aumentare la sensibilità dei sistemi agli stimoli topologici indotti e conseguentemente di rendere più efficace lo scambio di materia.

1.3 Generazione di gradienti di concentrazione di ossigeno

Numerosi in letteratura sono i dispositivi microfluidici utilizzati per creare gradienti di concentrazione di ossigeno.

Nel 2011 *Abaci et al* hanno sviluppato un particolare microbioreattore (Figura 1.2) con la capacità di monitorare continuamente il livello di ossigeno disciolto nel microambiente cellulare, con l'obiettivo di studiare il comportamento cellulare all'esposizione a diversi livelli di ossigeno. In questo lavoro è stato proposto l'utilizzo di due canali separati da una membrana permeabile all'ossigeno, in cui da un lato è contenuta la coltura cellulare, mentre dell'altro è presente l'ossigeno disciolto che può diffondere nella camera di coltura. In questo caso si è minimizzato il contatto tra le due fasi e ridotto lo *shear-stress* nella coltura.

Un altro gruppo di ricerca ha sviluppato una piattaforma in PDMS e vetro, all'interno della quale scorrono due strati diversi di micro canali: il primo strato è riservato al liquido e il secondo al gas. Tali canali sono separati da uno strato molto sottile di PDMS. Il dispositivo consente l'inserimento fino a nove concentrazioni di ossigeno in fase gas, permettendone il trasferimento alla fase liquida. Ogni miscela di gas azoto-ossigeno è controllata e determinata da un *computer-controller*, in modo da settare singolarmente la concentrazione di ossigeno in entrata di ogni canale. Questo fa nascere la possibilità di generare gradienti di O_2 di diversa forma (lineare, esponenziale, non monotona) nello stesso dispositivo e di modificarne la direzione o l'ampiezza in un tempo inferiore a 0,5 minuti. (*Adler et al, 2009*)

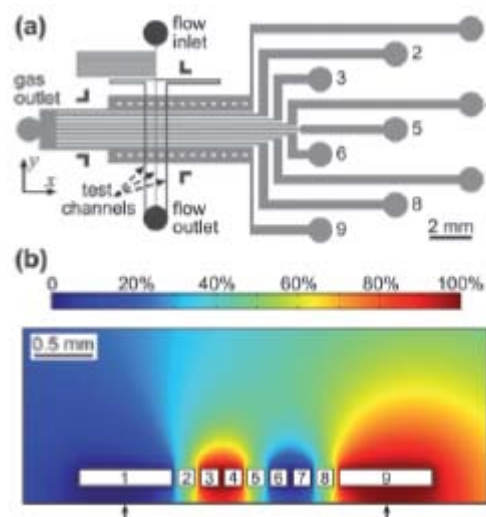


Figura 1.2. (a) Struttura dei micro canali nel dispositivo, gli ingressi del gas sono numerati dall'uno al nove. (b) Concentrazione dell'ossigeno nel dispositivo all'entrata dei 9 canali.

Nel 2012 *Martewicz et al* hanno superato la difficoltà di creare transienti rapidi (dell'ordine dei minuti) della concentrazione di ossigeno a partire da un livello di saturazione raggiungendo condizioni ipossiche in modo reversibile, grazie ad uno scambiatore microfluidico gas-liquido in PDMS e vetro. Con questo metodo sono riusciti a mimare le condizioni che avvengono *in vivo* nella prima fase acuta di ipossia che si ha successivamente all'ischemia, studiando le dinamiche dello ione calcio in una coltura di cardiomiociti sottoposti ad una diminuzione improvvisa della concentrazione di ossigeno.

Il microscambiatore consiste in otto unità di scambio poste in serie per formare una serie di otto canali di lunghezza 80 mm, larghezza 100 micron e 40 micron di altezza. Lo scambio avviene grazie ad una membrana sottile in PDMS: al di sopra della membrana scorre la miscela gassosa mentre al di sotto, nei canali microfluidici, scorre il liquido che si vuole arricchire o impoverire di ossigeno. Nella prossima Figura 1.3 è riportato il dispositivo.

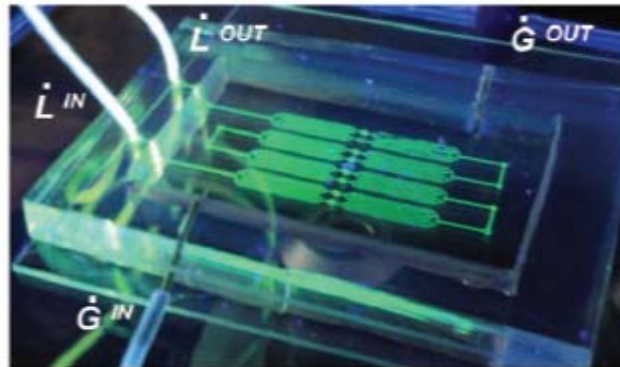


Figura 1.3. Immagine dello scambiatore, gli ingressi della fase gassosa e di quella liquida.

1.4 Motivazioni e scopo della tesi

Nei sistemi complessi fisiologici *in vivo* l'ossigeno svolge un ruolo chiave nell'ottenimento e nel mantenimento delle funzioni metaboliche cellulari.

Il livello di ossigeno disciolto nell'ambiente di coltura ha una profonda influenza sulla trasmissione dei segnali cellulari, sulla produzione di fattori di crescita, sul differenziamento e crescita cellulare (*Muschler et al., 2004*). È stata dimostrata come la presenza di gradienti di ossigeno, ad esempio nei lobuli epatici, determini cambiamenti fenotipici e funzionali nello stesso tipo cellulare. Nella generazione di colture di epatociti da cellule staminali e nella coltura di epatociti primari non esiste un reale controllo della concentrazione di ossigeno nel medium di coltura. Per questo motivo non si riescono ad ottenere cellule mature a livello

fenotipico e funzionale: il differenziamento termina con l'ottenimento di precursori epatici che non presentano tutte le funzioni fisiologiche presenti nell'organo.

L'obiettivo di questa tesi è la progettazione e fabbricazione di un dispositivo microfluidico per il controllo della concentrazione di ossigeno all'interno di una camera di coltura microfluidica per il differenziamento di epatociti da cellule staminali embrionali e da cellule pluripotenti indotte. Il sistema dovrà garantire la generazione di un gradiente stabile all'interno del medium cellulare senza perturbare il microambiente di differenziamento.

Il differenziamento in epatociti segue infatti un protocollo di coltura lungo e delicato e risulta fortemente influenzato dai fattori endogeni prodotti dalle cellule stesse e da fattori esogeni forniti nel medium di differenziamento. Per questo lavoro di tesi si è perciò deciso di adottare un sistema microfluidico multistrato che permetta da un lato lo scambio di ossigeno e la generazione di un gradiente sulla coltura, dall'altro di preservare la nicchia endogena prodotta durante il differenziamento.

Attraverso un modello computazionale saranno analizzate le variabili progettuali di interesse, preservando i vincoli imposti per il corretto differenziamento cellulare. Saranno ad esempio analizzati gli effetti sul gradiente di ossigeno dovuto alle dimensioni della membrana di scambio o alle condizioni di coltura in ambiente normossico o ipossico. Nella fase successiva verrà prodotto il dispositivo e verranno svolti alcuni test sperimentali di validazione.

Il gradiente di concentrazione all'interno della coltura dovrà essere mantenuto per l'intera durata del differenziamento perciò il sistema dovrà essere molto robusto e non facilmente perturbabile.

Capitolo 2

Materiale e Metodi

In questo capitolo si riportano le tecniche e i materiali utilizzati per la fabbricazione del dispositivo microfluidico e per l'allestimento degli esperimenti effettuati durante la validazione sperimentale.

2.1 Proprietà del PDMS

Il polidimetilsilossano (PDMS) trova largo impiego nella fabbricazione di dispositivi microfluidici, in particolare applicazioni biomediche, a causa delle sue proprietà chimico-fisiche, affiancate anche da un costo moderato.

Il PDMS è un silossano scoperto nella metà del ventesimo secolo, in cui l'unità monomerica che lo forma è $[-Si(CH_3)_2O-]$: si ha quindi un'unità inorganica (gruppo silossanico) unita a due gruppi organici metilici, il tutto ripetuto n volte per formare il copolimero. Il PDMS è dotato di una buona stabilità termica e la bassa temperatura di transizione vetrosa (-125°C) ne permette una buona flessibilità, per questa ragione è facilmente malleabile a temperatura ambiente.

Altra importante caratteristica è la buona permeabilità alle sostanze gassose, in particolare ossigeno, azoto e anidride carbonica, unita ad una bassa permeabilità all'acqua. L'elasticità di questo polimero ne facilita la manipolazione e lo rende adatto nella formazione di membrane sottili.

Il PDMS viene prodotto mescolando due componenti diversi: una base (fornita dalla ditta Invitrogen) e un reticolante (fornita dalla ditta Sylgard) in rapporto di peso 10:1. Le temperature alla quale il silicone polimerizza variano a seconda del tempo di cottura in modo inversamente proporzionale. Ad una temperatura di 80°C corrisponde una cottura di 2 ore, mentre a 60°C sono necessarie almeno 4 ore. La polimerizzazione del PDMS a temperatura ambiente avviene dopo 24 ore.

2.2 Soft-litografia

La tecnica che si descrive in questo paragrafo è una pratica di micro fabbricazione che permette di imprimere una particolare geometria ad un materiale elastomerico attraverso uno stampo precedentemente prodotto. Sono riportate in seguito le sue fasi.

2.2.1 Creazione della geometria

Inizialmente viene creato il disegno con un programma di grafica (solitamente AUTOCAD) e successivamente avviene lo stampaggio su pellicola serigrafica trasparente ad alta risoluzione (da 8000 a 20000 dpi a seconda della dimensione minima presente nel disegno).

2.2.2 Produzione del master in silicio

Per la produzione dello stampo si utilizza un substrato in silicio. Il wafer (3, 4 o 5 inch di diametro) viene pulito tramite un lavaggio in sequenza con acetone, metanolo e acqua distillata. Un'asciugatura veloce con aria e un successivo mantenimento su piastra calda (a 100°C per almeno 15 minuti) assicurano la completa disidratazione del wafer, allo scopo di favorire l'adesione del photoresist. E' necessario che queste operazioni vengano effettuate con cautela, in modo da evitare il deposito superficiale di polveri che potrebbero creare problemi nelle successive fasi.

A questo punto si sceglie il photoresist adatto: nel lavoro di tesi presentato è stato utilizzato SU-8 2050 (Microchem), una particolare resina epossidica fotosensibile negativa. Tale resist permette l'ottenimento di un film polimerico sulla superficie del wafer di 50 micron. In Tabella 2.1 si riportano alcune caratteristiche dei photoresist della famiglia SU-8 2000.

SU-8 2000	% Solids	Viscosity(cSt)	Density (g/ml)
2025	68.55	4500	1.219
2035	69.95	7000	1.227
2050	71.65	12900	1.233
2075	73.45	22000	1.236

Tabella 2.1. Proprietà fisiche del fotoresist, fornite da Microchem.

La Figura 2.1 riporta, invece, la corrispondenza tra velocità di spin e spessore ottenuto per i diversi tipi di resist.

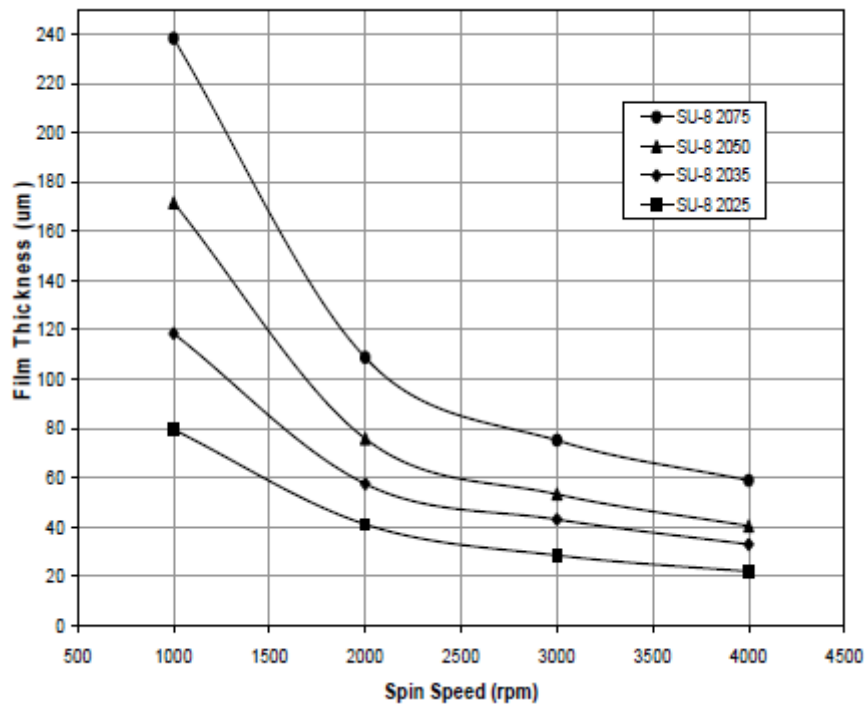


Figura 2.1. Relazione tra velocità di spin (rpm) e lo spessore del film che si desidera ottenere per diversi tipi di fotoresist.

Il wafer, dopo l'asciugatura, si fissa all'interno di uno spin coater e si depone una goccia di resist al centro del wafer, fino ad occupare circa il 30% della superficie disponibile.

Il programma utilizzato è composto da due step successivi:

1. Spin a 500 rpm per 10 secondi con accelerazione di 100 rpm/sec;
2. Spin a 3000 rpm per 35 secondi con un'accelerazione di 300 rpm/sec per arrivare allo spessore richiesto.

Nel primo step si ha una distribuzione del liquido su tutta la superficie del wafer, mentre nel secondo si ottiene lo spessore desiderato. A questo punto il wafer viene lasciato riposare su una superficie piana per almeno 10 minuti. Successivamente si procede alla prima fase di cottura (soft bake) su piastra riscaldante.

La Tabella 2.2 riporta i tempi di cottura in funzione dello spessore del film polimerico. In questo caso 2 minuti a 65°C, seguiti da 8 minuti a 95°C.

THICKNESS	SOFT BAKE TIMES	
	(65° C)	(95° C)
microns	minutes	minutes
25-40	0-3	5-6
45-80	0-3	6-9
85-110	5	10-20
115-150	5	20-30
160-225	7	30-45

Tabella 2.2. *Tempi di soft bake alle due temperature in funzione dello spessore del resist.*

La prossima fase è rappresentata dall'esposizione con lampada a raggi UV. Anche l'energia di esposizione (Tabella 2.3) varia a seconda dello spessore del film del resist, e per 50 micron vale 150 mJ/cm^2 . Prima di esporre il polimero si interpone, tra la luce e il resist, la lastra fotografica contenente la geometria desiderata.

THICKNESS	EXPOSURE
	ENERGY
microns	mJ/cm²
25-40	150-160
45-80	150-215
85-110	215-240
115-150	240-260
160-225	260-350

Tabella 2.3. *Energia di esposizione in funzione dello spessore del resist.*

L'ulteriore cottura, detta di post esposizione (PBE), è necessaria per polimerizzare efficacemente il resist esposto e far evaporare il solvente residuo ancora presente sulla superficie. Anche in questo caso il tempo di riscaldamento, sempre su piastra, dipende dallo spessore del film depositato, come riportato in Tabella 2.4.

THICKNESS microns	SOFT BAKE TIMES	
	(65° C) minutes	(95° C) minutes
25-40	1	5-6
45-80	1-2	6-7
85-110	2-5	8-10
115-150	5	10-12
160-225	5	12-15

Tabella 2.4. *Tempi di cottura nella PEB in funzione dello spessore.*

Si sottolinea il fatto che in entrambe le cotture il riscaldamento a 65°C è facoltativo, ma consigliato perchè riduce le tensioni interne ma non modifica la durata della cottura a 95°C.

Nell'ultimo passaggio, detto di "sviluppo", il polimero non reticolato, cioè quello non esposto alla luce UV, viene sciolto in un solvente: il metossimetacrilato (Sigma). Una vigorosa agitazione riduce il tempo totale dello sviluppo.

Trascorso il tempo di sviluppo è necessario controllare che il polimero non reticolato sia stato del tutto eliminato dalla superficie mediante l'isopropanolo (Sigma) che è un buon indicatore poichè fa risaltare l'eventuale polimero sotto forma di un alone biancastro.

L'ultima fase è quella di hardbake. Essa è importante per rendere il polimero resistente alle alte temperature, aumentarne la resistenza meccanica e completare la polimerizzazione del polimero. Si pone lo stampo su di una piastra alla temperatura di 65°C per 2 minuti, dopodichè si imposta una rampa di 120°C/ora fino a raggiunge i 160°C per la durata complessiva di 2 ore. Trascorso questo tempo si preleva il wafer dalla piastra solo dopo che quest'ultima è scesa, raggiungendo una temperatura inferiore ai 50°C.

2.2.3 Produzione dello stampo in PDMS

Prima di produrre lo stampo in silicone servono alcuni accorgimenti:

- trattamento dello stampo con aria compressa, in modo da eliminare le impurità presenti in superficie (ad esempio la polvere);
- trattamento della superficie con vapori di clorodimetilsilano a temperatura ambiente per 15-30 minuti.

La miscela di PDMS (Sylgard Dow Corning) viene preparata mescolando in un contenitore la base e l'agente reticolante in un rapporto 10:1. Le due diverse sostanze devono essere mescolate sotto cappa per qualche minuto, così da formare un composto omogeneo. L'aria inglobata durante il mescolamento viene eliminata ponendo il PDMS ancora non reticolato all'interno di un cristallizzatore sotto vuoto, fino a completa scomparsa delle bolle.

Si procede versando la miscela siliconica sopra il master rigido e ripetendo l'operazione di degasaggio. A completa scomparsa delle bolle si pone lo stampo con il silicone in forno per 2 ore a 80°C.

In Figura 2.2 è schematizzato il processo per la produzione dello stampo di PDMS come appena descritto.

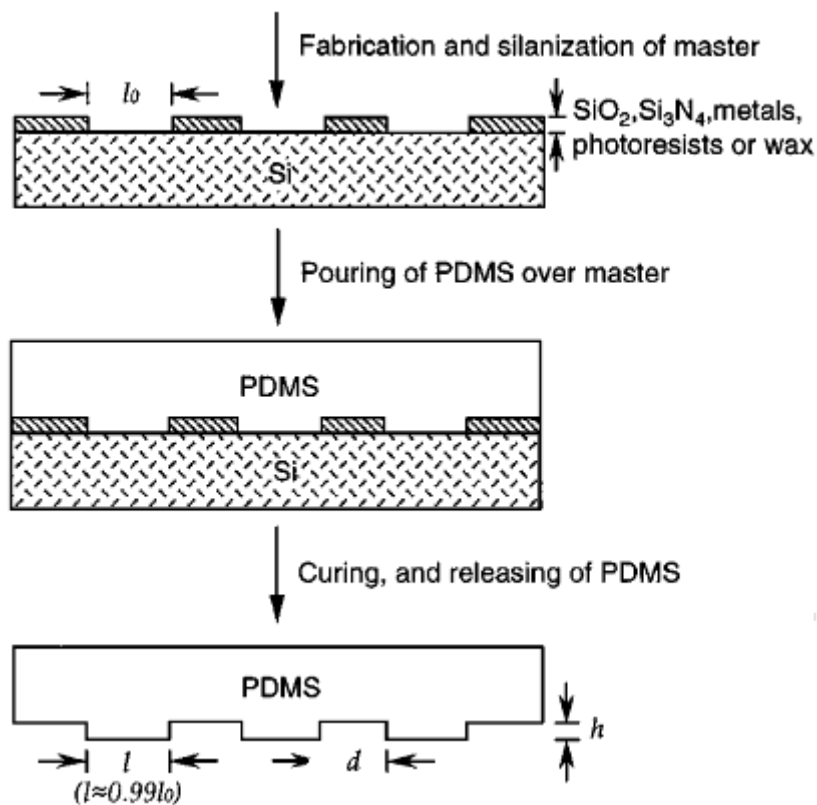


Figura 2.2. Schema del procedimento per produrre uno stampo in PDMS da un master con profili in rilievo.

2.2.4 Produzione dello strato sottile in PDMS

Quando si vogliono produrre spessori sottili (da 20 a 300 micron) è necessaria una procedura diversa rispetto a quella appena descritta, infatti la precedente è utilizzata solo per spessori di PDMS superiori al millimetro. Nel dispositivo che si sviluppa in questa tesi è necessario produrre anche uno strato più sottile, di 150 micron. La quantità di PDMS utilizzata è all'incirca 5 grammi e la procedura di preparazione è la stessa descritta nel paragrafo 2.2.3.

La membrana sottile viene generata sopra lo stampo in silicio utilizzando uno spin coater. Anche in questo caso esiste una relazione tra lo spessore del film polimerico da ottenere e la velocità di rotazione.

Per ottenere uno spessore di 150 μm si imposta una velocità di 1100 rpm, con un'accelerazione di 300 rpm/sec per un tempo di 1 minuto e 15 secondi. È necessario far riposare il wafer su una superficie perfettamente piana per circa un'ora, in modo da uniformare la distribuzione del polimero sulla sua superficie. Al termine il wafer è posto in forno a 80°C per circa 1 ora. L'estrazione dello strato sottile e la pulizia dello stampo verranno descritte nel paragrafo successivo.

2.3 Tecniche di adesione di più strati

Quando entrambi gli stampi di PDMS sono stati estratti dal forno e fatti raffreddare, si deve unire irreversibilmente lo strato sottile a quello più spesso. Si taglia con un bisturi lo strato spesso seguendo le righe guida e si eseguono i buchi relativi all'ingresso dei tubi per i fluidi con un ago da 22G.

In questo lavoro di tesi viene utilizzato il trattamento al plasma per far aderire i due strati. Il plasma è un gas parzialmente ionizzato, ma nel complesso neutro, che viene generato da un apposito strumento, 'Plasma Cleaner' della ditta Harrick Plasma. All'interno della camera di plasmatura vengono posti gli oggetti da far aderire con la superficie da plasmare rivolta verso l'alto. Con l'ausilio di una pompa da vuoto viene raggiunta una pressione di 0.3 millibar, solo a quel punto si genera il plasma attraverso il campo magnetico generato dalla bobina che riveste la camera del plasma. Il plasma è mantenuto per 2 minuti, dopodiché gli oggetti vengono estratti e fatti aderire in modo che si formino forti legami covalenti tra le due superfici poste a contatto. È necessario allineare con precisione i due strati, altrimenti il dispositivo non potrà essere utilizzato e proprio per questa ragione l'allineamento viene effettuato utilizzando uno stereo microscopio (Leica). Per completare l'adesione si procede con un riscaldamento su piastra calda a 80°C per almeno 15 minuti. Se sono presenti delle bolle d'aria è necessario eliminarle sottoponendole a leggera pressione alternata tramite polpastrelli, facendo attenzione a non collassare le camere l'una sull'altra.

Il passaggio successivo consiste nell'adesione, sempre con il trattamento al plasma, del chip multistrato appena descritto ad un vetrino da microscopia 25x75 mm (Vetrotecnica). I vetrini utilizzati sono prima puliti con della Cleaning Solution Micro-90® (Sigma) al 2% in acqua, risciacquati con acqua distillata e poi asciugati con aria compressa. Una buona pulizia del materiale da plasmare favorisce l'adesione al PDMS e aiuta a mantenere il Plasma Cleaner in buone condizioni.

Ripetendo la plasmatura tra il vetrino e il PDMS multistrato si ottiene il dispositivo finale.

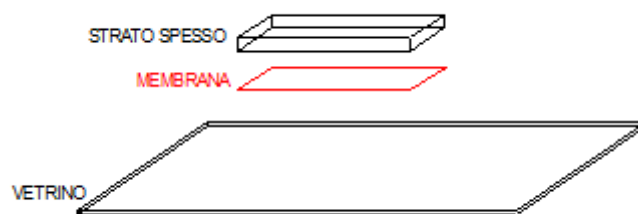


Figura 2.3. Schematizzazione dei tre strati che compongono il dispositivo.

La piattaforma realizzata risulta quindi formata da tre strati:

- il vetrino che serve da sostegno al chip;
- lo strato sottile che corrisponde alla camera di coltura;
- lo strato spesso di PDMS in cui si ha la generazione del gradiente.

La camera di coltura si trova allineata sotto la zona di formazione del gradiente: la membrana sottile, con cui è formata la camera di coltura, separa le due zone e favorisce la permeazione dell'ossigeno.

È dunque permesso lo scambio di gas ma non di liquido tra le due zone adiacenti, in questo modo i due fluidi agiscono in maniera indipendente.

2.4 Strumenti per il controllo della portata in fase liquida

Di seguito sono illustrati gli strumenti utilizzati per il controllo e movimentazione di liquidi nei chip microfluidici.

2.4.1 Pompa a siringa

Per controllare e impostare la portata di liquido nella prove sperimentali effettuate con i coloranti e con la fluoresceina è stata utilizzata una pompa a siringa: un apparecchio ideato appositamente per applicazioni microfluidiche, poiché in grado di erogare portate molto basse da 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ fino a 112 ml/min.

L'apparato utilizzato è costituito da una parte meccanica al di sopra della quale vengono posizionate fino ad un massimo di 10 siringhe contemporaneamente e il collegamento alla parte di software e controllo avviene grazie ad un cavo lungo 5 m. Questo macchinario permette l'utilizzo di siringhe di diverso tipo e materiale (vetro o plastica).

È importante che le siringhe con la soluzione da pompare siano prive di bolle d'aria: si evita così la propagazione delle bolle all'interno del dispositivo microfluidico.

Si sono calcolati i tempi di autonomia della pompa in funzione della portata e del volume della siringa utilizzata. Terminato il tempo di autonomia si raggiunge lo svuotamento della siringa ed è necessario riempirla manualmente per consentire il prolungamento dell'esperimento, provocando però una perturbazione al sistema. La siringa utilizzata per i calcoli è quella di volume massimo per questo tipo di pompa, 50 mL.

PORTATA	TEMPO
MicroL/Min	AUTONOMIA
	ore
5	166.6
50	16.6
100	8.3
150	5.5

Tabella 2.5. *Tempo di autonomia di una siringa da 50 ml in funzione della portata adottata.*

Dai dati sopra riportati risulta evidente come sia preferibile utilizzare basse portate per evitare frequenti interruzioni del moto del fluido che andrebbero ad incidere sulla stazionarietà del gradiente. Come verrà risaltato nel prossimo capitolo, questo approccio risulta sconveniente dal punto di vista tecnico, poiché per portate basse il gradiente di concentrazione potrebbe essere non sufficientemente marcato sulla coltura. E' necessario quindi trovare il giusto compromesso tra questi fattori. Una valida alternativa è quella di sostituire le pompa a siringa con una pompa peristaltica (2.4.2).



Figura 2.4. *Immagine della pompa a siringa.*

2.4.2 Pompa peristaltica

Per esperimenti a lunga durata viene utilizzata una pompa peristaltica multicanale con motore Masterflex L/S Variable-Speed Modular Driver e testa Ismatec Minicartridge Pump Heads ad alta precisione (General Control, Milano), essa riesce a garantire una certa continuità che sarebbe difficoltoso mantenere con altri tipi di pompa.

Nella testa della pompa vengono inseriti dei tubi in silicone (Masterflex), fino ad un massimo di otto contemporaneamente: il movimento rotatorio dei rulli permette al liquido di scorrere in maniera continua. I tubi hanno inoltre tre stopper che li bloccano in una determinata posizione e ne impediscono il trascinarsi al di fuori della pompa in seguito al movimento rotatorio dei rulli. La portata di liquido viene regolata scegliendo diametro dei tubi e velocità di rotazione dei rulli, impostata con il regolatore del voltaggio di alimentazione del motore.

I tubi a monte sono immersi in un serbatoio contenente la riserva di liquido che, a causa della sua elevata capacità (sopra il litro), garantisce la continuità del pompaggio senza interruzioni per l'intera durata dell'esperimento. Il risultato è, però, una portata pulsante con frequenza direttamente proporzionale al movimento dei rulli. Per questo motivo è necessario utilizzare in mandata ed in uscita delle giunture di tubi in silicone di diversi diametri (Masterflex) che si deformano in maniera elastica, riuscendo a smorzare l'effetto della pulsazione, rendendo la portata costante.

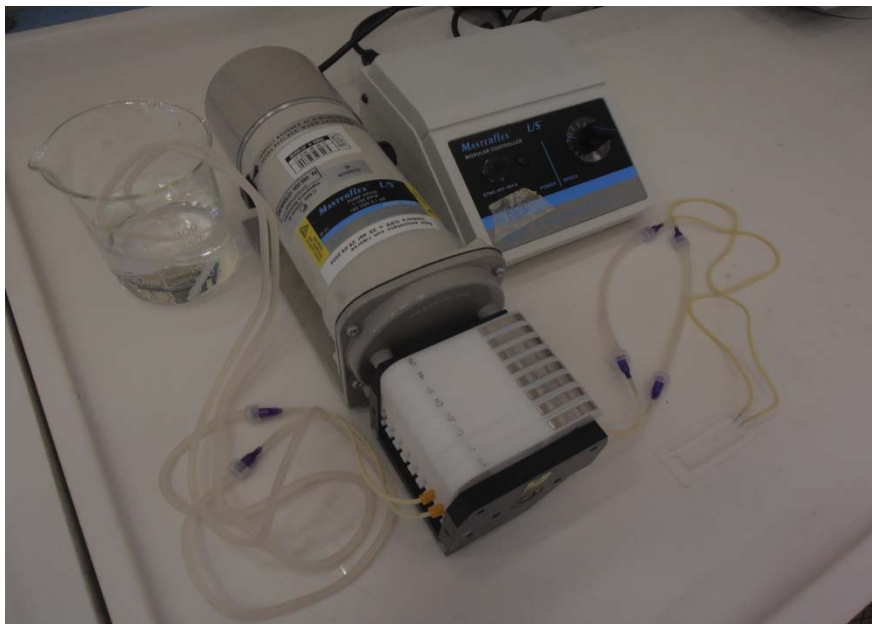


Figura 2.5. Immagine della pompa peristaltica.

2.4.2.1 Taratura pompa peristaltica

La pompa peristaltica è stata calibrata in modo da ottenere portate nell'ordine dei 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. I tubi utilizzati sono del tipo Pump Tubing Pharmed BTP in silicone (Cole Parmer Instrument) e per la calibrazione della pompa sono state utilizzate dodici eppendorf (BD) da 1,5 ml. In tabella 2.6 e 2.7 sono riportati i dati relativi alla calibrazione della pompa e la relativa portata in funzione del numero di giri del motore della pompa. Nell'esperimento si è raccolto il liquido erogato da un singolo tubo della pompa per un tempo di campionamento pari a 2 minuti. La differenza in peso tra la eppendorf piena e vuota fornisce il volume di liquido pompato, da questo dato è possibile calcolare la portata volumetrica in ml/min .

NUMERO	PESO VUOTO Grammi	PESO PIENO Grammi	VOLUME	
			ACQUA Grammi	PORTATA ml/min
1	0,487	0,683	0,196	0,098
2	0,485	0,680	0,195	0,0975
3	0,489	0,686	0,197	0,0985
4	0,485	0,676	0,191	0,0955
5	0,487	0,678	0,191	0,0955
6	0,487	0,681	0,194	0,097

Tabella 2.6. Sei misurazioni di portata della pompa peristaltica con numero di giri $N=1$.

NUMERO	PESO VUOTO Grammi	PESO PIENO Grammi	VOLUME	
			ACQUA Grammi	PORTATA ml/min
7	0,485	1,008	0,523	0,261
8	0,489	1,009	0,520	0,260
9	0,492	1,021	0,529	0,264
10	0,487	1,005	0,518	0,259
11	0,487	1,005	0,517	0,258
12	0,488	1,012	0,524	0,262

Tabella 2.7. Sei misurazioni di portata della pompa peristaltica con numero di giri $N=2$.

Non è stato necessario effettuare le misure con un numero di giri più elevato perché con numero di giri pari a 2 è già superato il valore di portata massimo richiesto per gli esperimenti.

2.5 Simulazioni computazionali

Per la risoluzione di bilanci di materia e quantità di moto è stato utilizzato il software COMSOL Multiphysics, che in questo caso è stato applicato per ricavare una soluzione numerica di geometrie bidimensionali.

Il programma lavora con il metodo degli elementi finiti, discretizzando il dominio di partenza in tante unità elementari di forma semplice. La mesh, costituita da elementi triangolari, è stata raffinata in punti strategici in modo da ottenere soluzioni stabili con una tolleranza relativa pari a 10^{-6} .

Il trasporto del momento della quantità di moto è descritto dall'equazione di Navier Stokes per sistemi incomprimibili:

$$\rho \frac{D \cdot v}{D \cdot t} = \rho \cdot g - \nabla \cdot P + \mu \cdot \nabla^2 v \quad (2.1)$$

Mentre il trasporto di materia è descritto dalla seguente legge generale, in questo caso considerando solo la presenza di moti convettivi e diffusivi all'interno del bilancio della specie:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = R + D \cdot \nabla^2 c - v \cdot \nabla c \quad (2.2)$$

Dove ρ (Kg/m^3) è la densità del fluido, μ ($\text{Pa} \cdot \text{s}$) è la viscosità dinamica ed entrambe queste proprietà sono considerate costanti, c (mol/m^3) è la concentrazione della specie, D (m^2/s) è il coefficiente di diffusione della specie nel fluido, v (m/s) è la velocità con cui si muove il fluido all'interno del sistema, t (s) è il tempo, g (m/s^2) è l'accelerazione di gravità, R ($\text{mol}/\text{s} \cdot \text{m}^3$) è il termine di reazione, P (Pa) è la pressione.

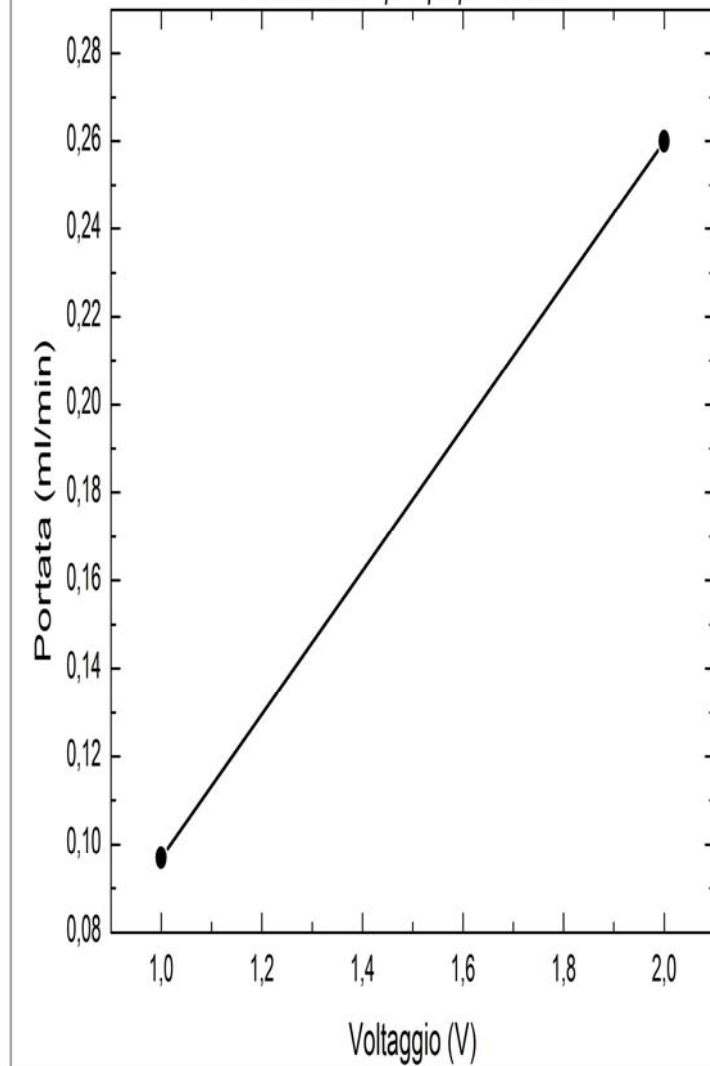
In questo lavoro di tesi sono stati considerati solamente sistemi allo stato stazionario.

Per risolvere il sistema di equazioni di bilancio, si devono fornire al software le proprietà fisico-chimiche delle specie presenti, le condizioni al contorno e quelle iniziali delle geometrie da simulare, che verranno riportate nel dettaglio nel prossimo paragrafo.

Retta taratura pompa peristaltica

Retta taratura pompa peristaltica

Retta taratura pompa peristaltica



software diversi
rimibile, a densità e

ra di 25°C e pressione

$$2.5 * 10^{-9} \frac{m^2}{s} \text{ (Perry,}$$

$$1 * \frac{10^{-9} m^2}{s} \text{ (Michielin,}$$

$$* \frac{10^{-9} m^2}{s} \text{ (Michielin,}$$

lizione).

na edizione).

oli totali di soluzione)

$$10^{-8} \text{ mol/m}^3 \cdot \text{atm} \cdot \text{s}$$

to).

$$P_{O_2} = 0 \text{ atm}$$

CAPITOLO 3

Sviluppo del dispositivo e test funzionali

In questo capitolo si riportano i risultati ottenuti tramite il software COMSOL Multiphysics allo scopo di valutare gli effetti di alcune variabili geometriche e operative sulla distribuzione dei profili di concentrazione del gradiente di ossigeno. In particolare saranno valutati i risultati relativi alla determinazione dell'altezza più opportuna della membrana in PDMS che separa la camera di coltura con la camera di generazione del gradiente. In seconda analisi sarà valutato l'effetto della portata sulla distribuzione della concentrazione di ossigeno all'interno della camera del gradiente.

3.1 Descrizione generale del sistema

Il sistema progettato dovrà essere in grado di garantire la distribuzione di un gradiente di ossigeno ad una camera di coltura senza perturbare l'ambiente cellulare.

La soluzione proposta è quella di trasferire al medium di coltura il gradiente di ossigeno generato in una camera posta al di sopra della coltura stessa. In tal modo si rendono indipendenti i fluidi dei due sistemi e si possono mantenere indipendenti i mezzi di coltura con il metodo di generazione del gradiente. Il trasferimento del gradiente avviene attraverso una sottile membrana permeabile di PDMS che separa la camera di coltura con la camera del gradiente.

Nella fase di progettazione alcuni vincoli sono dettati dal protocollo di coltura in microfluidica sviluppato nel laboratorio Bioera. In particolare le dimensioni della camera di coltura di altezza 200 μm , di larghezza 0.15 cm e lunghezza 1.8 cm sono dettate dalle dimensioni della coltura cellulare che deve essere ospitata.

È necessario scegliere la tipologia di gradiente da generare al di sopra della camera e la capacità di trasferimento del gradiente alla camera di coltura. In quest'ultimo caso sarà lo spessore della membrana in PDMS ad essere analizzato. Nel paragrafo seguente saranno presentate e discusse le simulazioni relative allo spessore della membrana di separazione e al profilo di gradiente da generare nella camera. Il paragrafo successivo tratterà invece degli

effetti della portata sulla formazione del gradiente. Nell'ultima parte verranno presentate alcune immagini relative al sistema fabbricato.

3.2 Valutazione delle variabili geometriche

3.2.1 Descrizione del sistema

La prima parte del lavoro di tesi riguarda la distribuzione del gradiente all'interno della camera di coltura, considerata una sezione trasversale del chip microfluidico. In questo modo sono stati valutati gli effetti dovuti ad alcuni parametri geometrici. Le seguenti simulazioni sono state utili per capire di quanti canali necessita il dispositivo per generare un gradiente di ossigeno stabile nel tempo e quale sia l'altezza corretta della membrana sottile per garantire il perfetto scambio di ossigeno tra la zona del gradiente e la camera di coltura.

Per fare ciò si considera una sezione trasversale in 2D, formata da quattro strati:

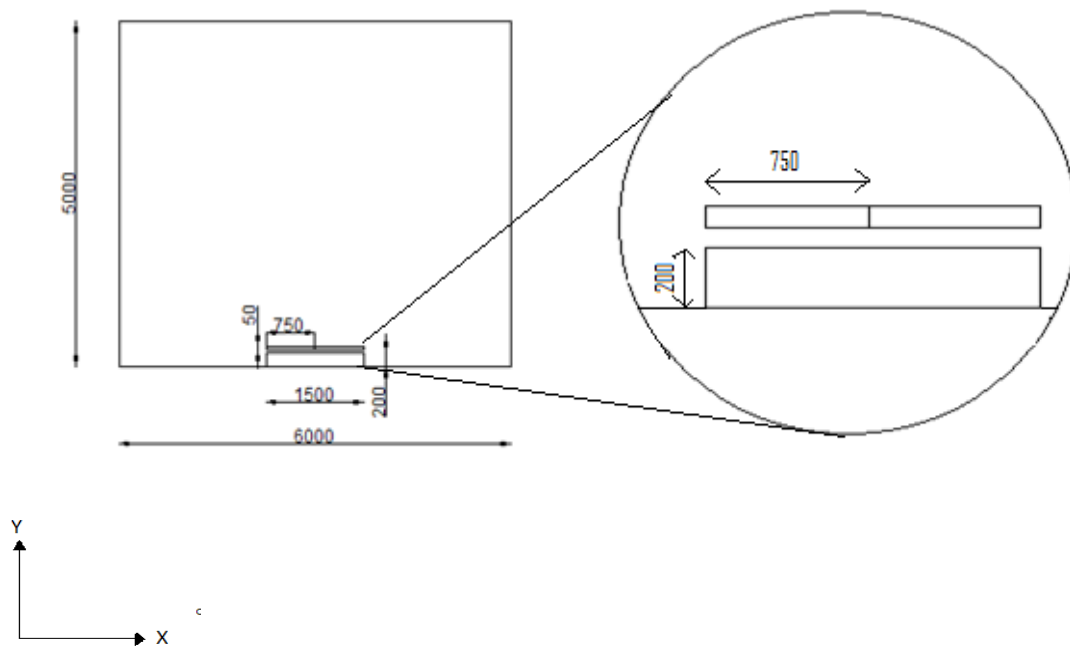
- Camera riservata alla coltura cellulare di altezza 200 μm e larghezza 1.5 mm.
- Membrana in PDMS di altezza sconosciuta (h) che deve essere determinata.
- Camera di altezza 50 μm e larghezza 1.5 mm all'interno della quale scorre il liquido con concentrazioni di ossigeno necessarie per generare il gradiente.
- Strato spesso di PDMS che forma il corpo del dispositivo di larghezza pari a 6 mm e altezza 5 mm.

Come accennato precedentemente, alcuni parametri sono definiti da regole stabilite durante ottimizzazioni precedenti. Ad esempio l'altezza e la larghezza della camera di coltura sono definite da vincoli di carattere tecnico, in quanto studi preliminari hanno riportato buoni risultati con camere microfluidiche di altezza minima della camera di 100 μm e lunghezza di 1.8 cm.

All'inizio del lavoro si è posto il problema del numero di canali da utilizzare per generare il gradiente. Le alternative più valide sono state le seguenti:

- un dispositivo con due canali in entrata nella camera, uno con una portata d'acqua contenente una pressione parziale pari al 21% di ossigeno e l'altro con la stessa portata d'acqua, ma con la pressione pari allo 0% di ossigeno. (Fig 3.1 a)
- un dispositivo con 10 canali in entrata nella camera, ognuno di essi contenente una portata d'acqua con una pressione parziale di ossigeno intermedia tra la condizione minima (0% di ossigeno) e massima (21% di ossigeno). (Fig 3.1 b)

(a)



(b)

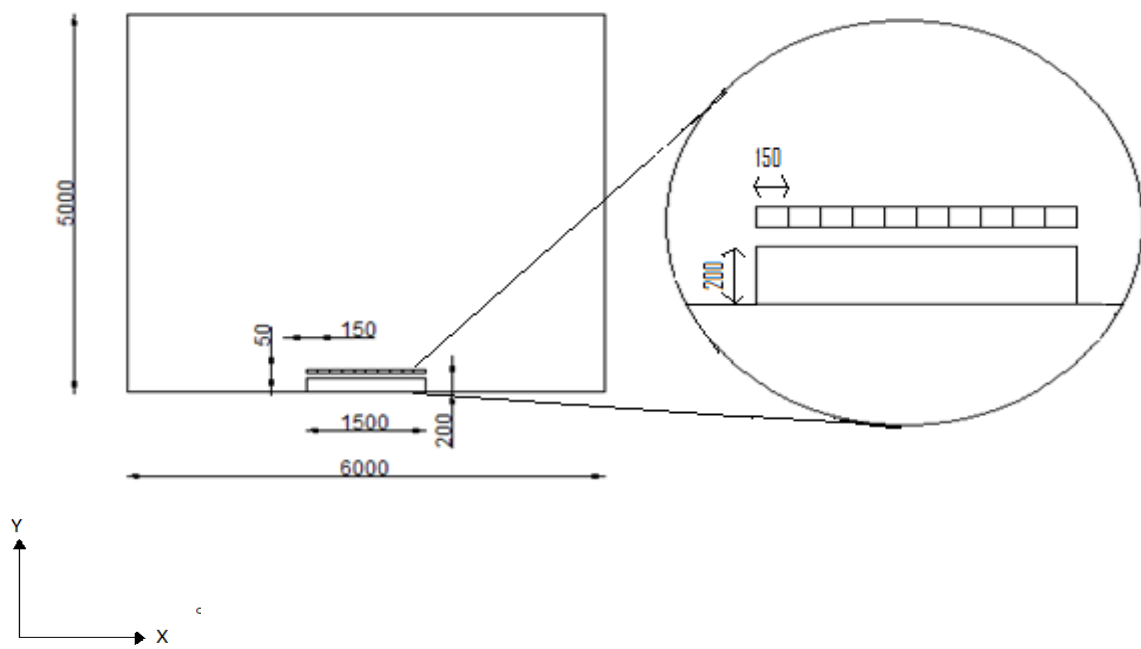


Figura 3.1. Geometria trasversale simulata: (a) con due canali (b) con dieci canali.

3.2.2 Proprietà del sistema

Nella camera di coltura è presente il medium (PBS). Per quanto riguarda invece la fase liquida che scorre all'interno dei canali e della camera di generazione del gradiente si tratta di acqua. Per il calcolo della concentrazione iniziale di ossigeno in $\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}$ a partire dalla pressione parziale di quest'ultimo nella fase acquosa, si considera la Legge di Henry:

$$P_{O_2} = Hx_{O_2} \quad (3.1)$$

Il valore di H , costante di Henry per l'ossigeno disciolto in acqua, trovato in letteratura (*Welty et al, 5th edition*) vale 45105,9 atm/(moli di O_2 in moli totali di soluzione) alla temperatura di 25°C mentre vale 51817,5 atm/(moli di O_2 in moli totali di soluzione) alla temperatura di 37°C.

La frazione molare dell'ossigeno in acqua, calcolata secondo (1), vale $5.25 \cdot 10^{-4}$ mol O_2 /mol soluzione. La concentrazione dell'ossigeno in acqua alla pressione atmosferica vale 0.292 mol/m^3 , dato ottenuto moltiplicando la frazione molare dell'ossigeno con il numero di moli d'acqua contenute in un metro cubo di soluzione ($5.56 \cdot 10^4$ mol). Nell'altro canale, invece, la concentrazione iniziale dell'ossigeno è posta nulla, essendo nulla la sua pressione parziale all'interno.

3.2.3 Condizioni al contorno e iniziali

Nel risolvere il modello si studia come unico fenomeno fisico la diffusione lungo y poiché ancora non si considera il movimento convettivo del liquido nei canali, ma si vuole focalizzare l'attenzione su come l'ossigeno diffonda all'interno del sistema su una zona trasversale del sistema. Inoltre si è considerato il sistema allo stato stazionario.

3.2.4 Analisi dei risultati

Si fissa una determinata altezza ipotetica di membrana (in questo caso 50 micron) e si confrontano i profili di concentrazione risultanti a metà camera di coltura derivanti dalle due diverse alternative progettuali, due canali e dieci canali.

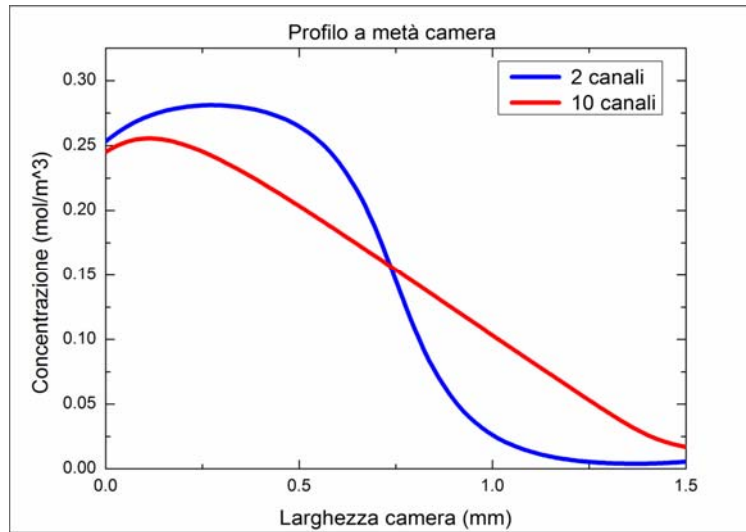


Figura 3.2. *Profili di concentrazione a metà della camera di coltura nel caso di due canali (blu) e di 10 canali (rosso).*

Dal confronto si osserva come il profilo ottenuto con due canali garantisca la formazione del gradiente solo nella zona di interfaccia, riducendo la zona interessata a poche centinaia di micron. Un profilo lineare è ottenuto invece con un ingresso di 10 canali a concentrazione decrescente. In questo modo tutta la sezione della camera è sottoposta ad un gradiente di concentrazione e le variazioni lungo x avvengono con linearità. In questo modo sono mimate con più precisione le condizioni *in vivo*.

Di seguito vengono riportati i profili di concentrazione dell'ossigeno a metà della camera di coltura a tre diverse altezze della membrana di separazione: 10 micron, 50 micron ed infine 100 micron.

(a)

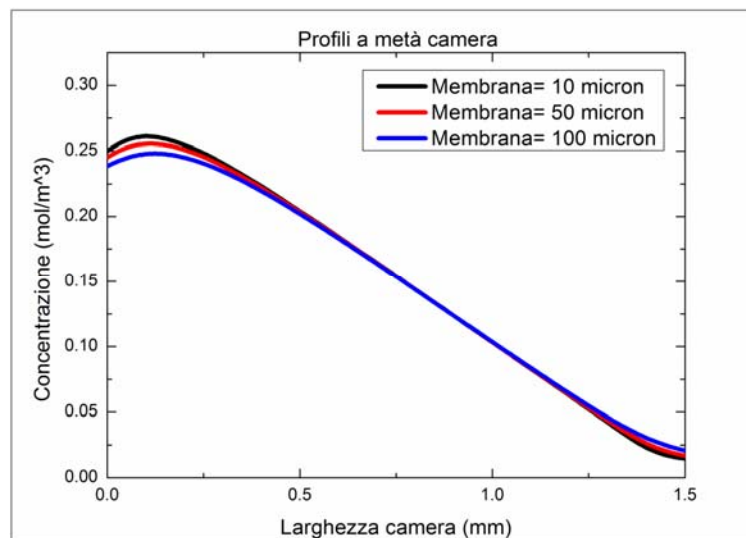


Figura 3.3. *Profili di concentrazione a metà della camera di coltura nel caso di altezza variabile della membrana nel caso di 10 canali.*

Dal confronto dei profili si nota come l'altezza della membrana nel range studiato non influenzi in modo significativo il trasferimento del gradiente nella camera di coltura. Solamente nelle vicinanze dei lati esterni della camera si ha una differenza di distribuzione dovuta alla diversa altezza della membrana permeabile, fatto che non compromette il buon esito degli esperimenti. Il dispositivo definitivo mantiene i due canali all'ingresso con pressione parziale di ossigeno in uno al 21%, mentre nell'altro allo 0%, ma la novità introdotta è una diramazione continua in otto stadi che porta ad avere, all'ingresso della camera dove si crea il gradiente, il totale di 10 canali che confluiscono simultaneamente ed ognuno di essi contiene una concentrazione di ossigeno intermedia rispetto alle due iniziali. Di seguito viene riportata schematicamente la geometria appena descritta.

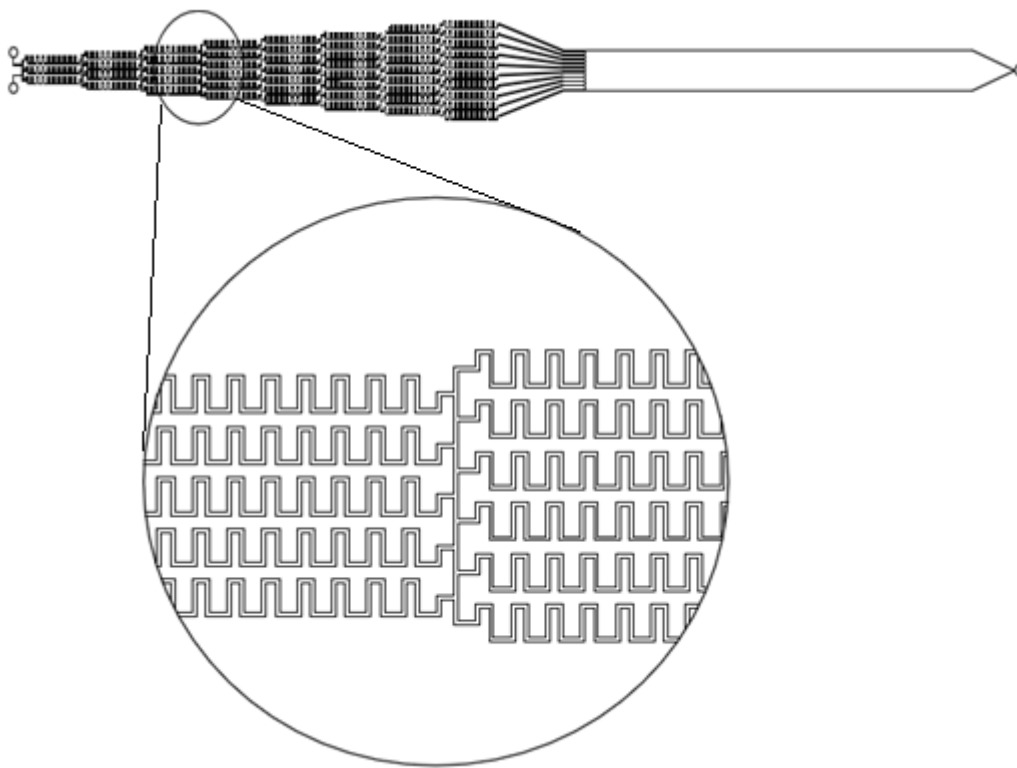
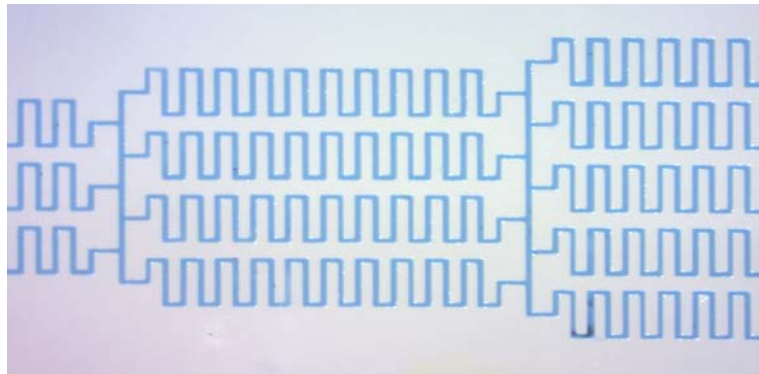


Figura 3.4. *Disegno del dispositivo intero con i microcanali e la camera, sotto un particolare.*

La geometria dei canali è ben visibile con l'aiuto di un colorante alimentare.

(a)



(b)

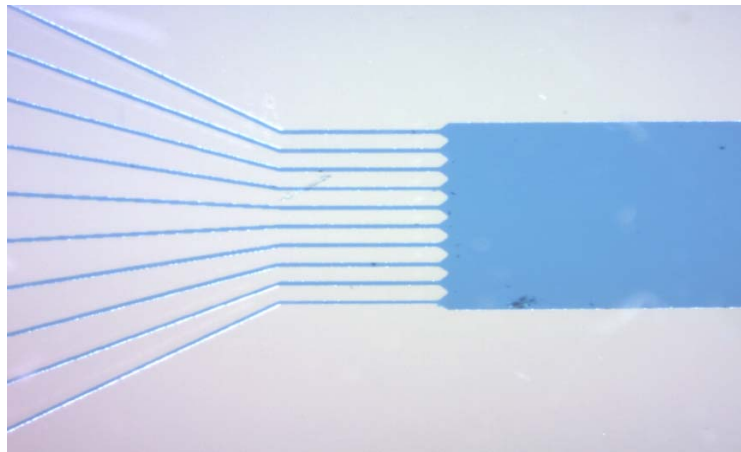


Figura 3.5. (a) Particolare della geometria dei canali (b) particolare dell'ingresso nella camera.

3.3 Valutazione delle variabili operative

I prossimi calcoli permettono la determinazione della portata da usare per assicurare la miglior condizione di generazione e soprattutto mantenimento del gradiente. La geometria simulata è la parte sovrastante la camera di coltura cellulare.

Quest'ultima è disegnata nella figura 3.6 con le relative quote. La zona di lavoro effettiva è quella compresa tra 1.5 cm, in modo da evitare perturbazioni che ci potrebbero a causa dell'immissione contemporanea dei 10 canali oppure nella zona di uscita.

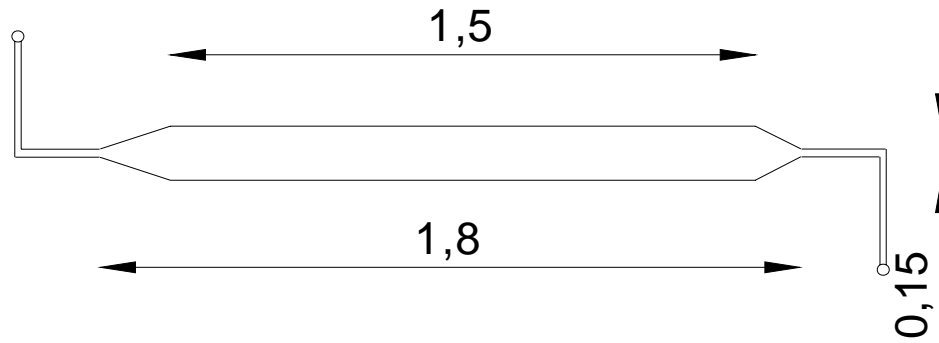


Figura 3.6. *Disegno della camera di coltura reale, le unità di misura sono cm.*

3.3.1 Descrizione del sistema

Nel caso della simulazione le misure adottate sono 1.8cmx1.5mm, volutamente maggiori di quelle della zona della camera interessata dal gradiente per preservare l'integrità del profilo sopra la camera. In questo secondo caso di studio valuta una sezione longitudinale del sistema con vista dall'alto. La camera di generazione del gradiente ha dimensioni rettangolari di 1.8cmx0.15cm e viene suddivisa in 10 domini di 0.15mmx18mm che rappresentano le diverse *streams* d'acqua con le corrispettive concentrazioni di ossigeno che si immettono nella camera e vengono mantenute all'interno di essa.

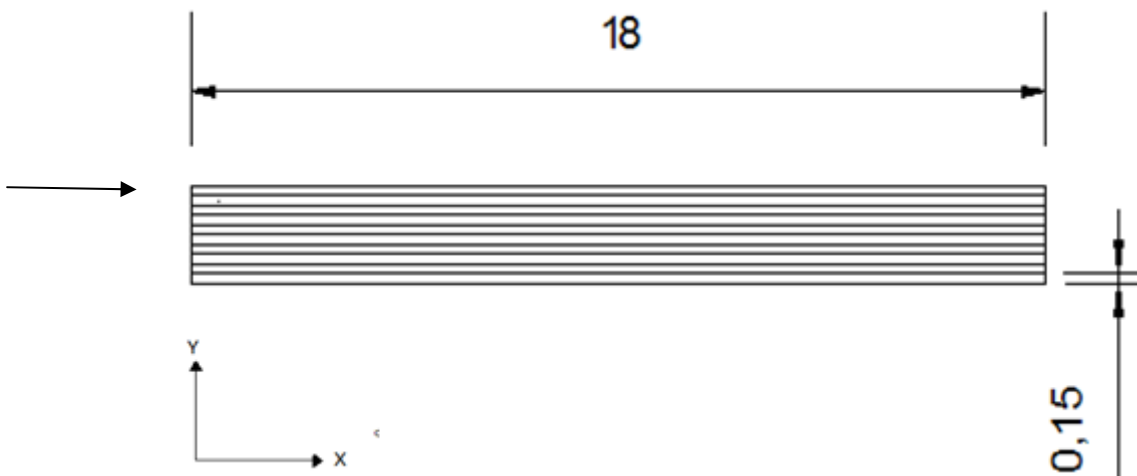


Figura 3.7. *Disegno della camera di generazione del gradiente simulata, le unità di misura sono mm e la freccia indica il verso del fluido.*

I fenomeni fisici che si governano l'ambiente sono stati descritti attraverso apposite equazioni per la convezione dell'acqua lungo l'asse x delle ascisse, la diffusione dell'ossigeno lungo l'asse delle ordinate ed equazioni per la quantità di moto, il tutto in regime stazionario. Fondamentali sono le condizioni iniziali e al contorno che definiscono il sistema.

Trattandosi di acqua, il fluido è considerato come incomprimibile, a densità e viscosità costanti $\rho = \text{costante}$ e $\mu = \text{costante}$.

Per descrivere il moto del fluido lungo le due direzioni ci si riferisce all'equazione di continuità:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \rho \cdot v = 0 \quad (3.2)$$

Che semplificata per le considerazioni sull'incomprimibilità del fluido diventa:

$$\nabla v = 0 \quad (3.3)$$

Esplicitata rispetto alle due variabili x e y del sistema:

$$\frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_y}{\partial y} = 0 \quad (3.4)$$

Con l'equazione di Navier-Stokes per fluidi incomprimibili si descrivere il trasporto della quantità di moto:

$$\rho \frac{D.v}{D.t} = \rho * g - \nabla * P + \mu \nabla^2 v \quad (3.5)$$

Che, essendo il fluido a viscosità costante, diventa:

$$\rho \frac{D.v}{D.t} = \rho * g - \nabla * P \quad (3.6)$$

Per descrivere il trasporto di materia la legge generale è:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = R + D * \nabla^2 c - \nabla c \cdot v \quad (3.7)$$

Applicando tale legge al problema in questione il termine di reazione (R) scompare perché non avviene nel sistema, si considerano il contributo diffusivo della specie lungo la coordinata y (attraverso la seconda legge di Fick) e quello convettivo della specie lungo la coordinata assiale, dovuto al moto del fluido (che rende il moto diffusivo lungo questa coordinata trascurabile). L'equazione con le dovute semplificazioni applicata alla specie i interessata (O₁₂) diventa:

$$\frac{\partial c_t}{\partial t} = D_t * \frac{\partial^2 c_t}{\partial y^2} - \frac{\partial v_x * c_t}{\partial x} \quad (3.8)$$

3.4 Condizioni del sistema

Per definire meglio il problema il software necessita delle condizioni iniziali e al contorno del sistema e delle proprietà dei materiali.

3.4.1 Condizioni iniziali

Per quanto riguarda il movimento convettivo del fluido si pone inizialmente la velocità nulla all'interno della camera, considerando il sistema non in movimento.

Nell'istante iniziale $t=0$ è stata imposta una concentrazione di ossigeno all'interno dei canali della camera nulla, presupponendo che non ci sia ancora dell'acqua all'interno del dispositivo:

$$c_{O_2}^{in} = 0 \quad (3.9)$$

3.4.2 Condizioni al contorno

Alle due pareti orizzontali esterne è stata imposta la condizione di non scorrimento, in quanto fisse. L'unica proprietà che esse hanno è la capacità di essere permeabile all'ossigeno. Per descrivere meglio la situazione reale si è posto un flusso di pari a:

$$N_{O_2}^{est} = K * (P_{O_2} - k * c_{O_2}) \quad (3.10)$$

Dove K è il coefficiente di scambio di materia ed è il risultato del rapporto tra permeabilità dell'ossigeno nel PDMS (P_{PDMS}) e lo spessore di quest'ultimo (δ). P_{O_2} è la pressione parziale dell'ossigeno all'interno dell'atmosfera che circonda il dispositivo, k_H è la costante di Henry dell'ossigeno e c_{O_2} è la concentrazione dell'ossigeno disciolto.

In tutte le pareti interne ideali il requisito è la continuità, così da non interferire in alcun modo con la diffusione dell'ossigeno. All'ingresso di ognuno dei 10 sottodomini è stata posta una velocità nulla lungo y e pari a v lungo x .

$$\text{In } x=0 \quad \begin{matrix} v_y = 0 \\ v_x = v \end{matrix} \quad (3.11)$$

Dove v è la velocità ricavata dalle differenti portate implementate, riportate in Tabella 3.1.

Per capire quale fosse il comportamento del gradiente alla diverse velocità di flusso sono state utilizzate diverse portate: 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. All'aumentare della portata si ha un aumento della velocità e una diminuzione del tempo di permanenza del fluido all'interno della camera.

PORTATA microL/min	VELOCITA' m/s
5	0.00011
20	0.00044
50	0.0011
100	0.0022

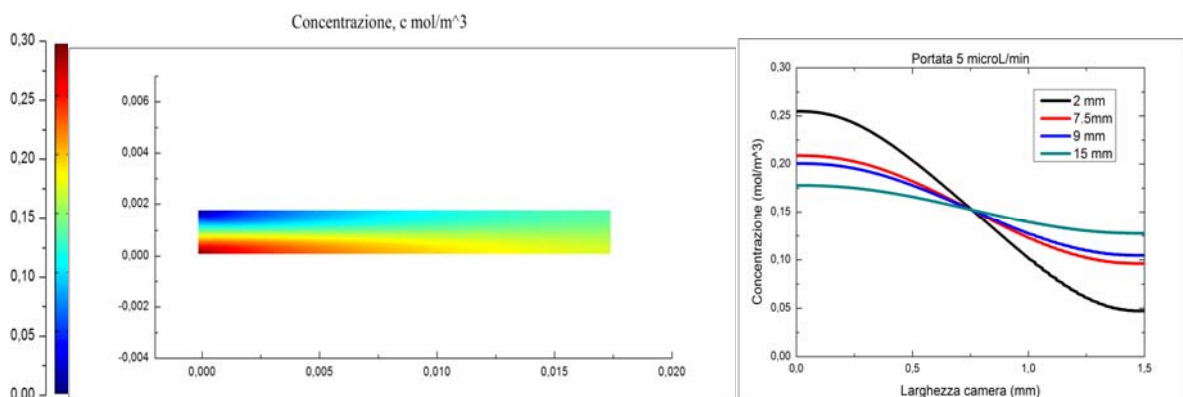
Tabella 3.1. Velocità in ogni canale all'ingresso della camera in funzione della portata.

Infine ad ogni ingresso dei canali nella camera è stata attribuita una concentrazione costante di ossigeno, intermedia tra il 21% e lo 0%, risultato di tutti i mescolamenti che avvengono durante la diramazioni dei canali dall'ingresso nel dispositivo

$c_{O_2} = 0,292 \frac{\text{mol}}{\text{m}^3}$ se la pressione parziale di ossigeno nell'acqua è al 21%, $c_{O_2} = 0$ se invece è nulla.

3.5 Analisi dei risultati

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti dalle La figura seguente rappresenta l'evoluzione del sistema in esame, posto in una atmosfera allo 0% di ossigeno, man mano che viene incrementata la portata in ingresso, mentre in Appendice A è riportato lo stesso processo, ma questa volta in un'atmosfera al 21% di ossigeno.



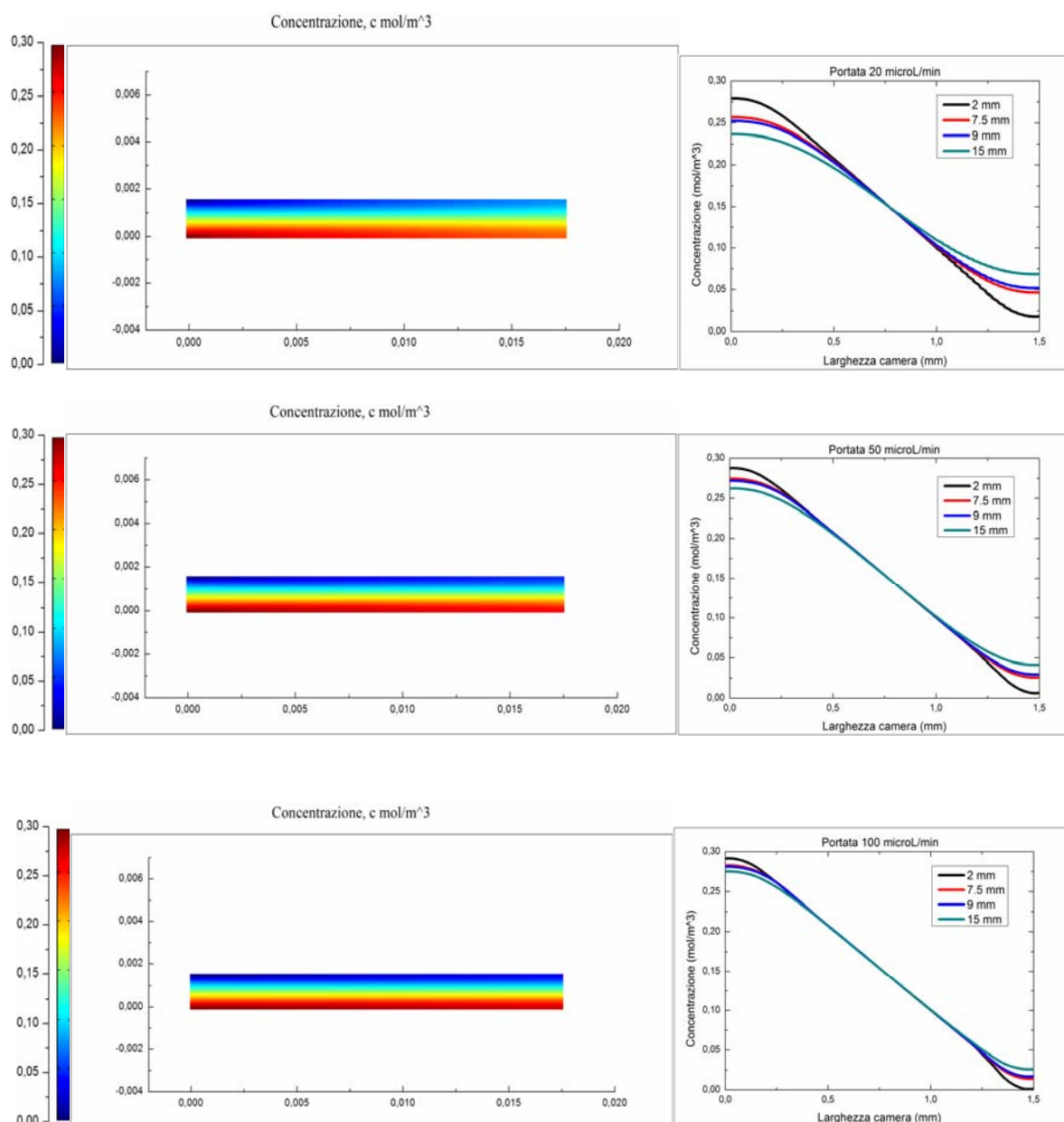


Figura 3.8. Immagini delle simulazioni della camera. (a) con portata 5 microL/min, (b) con portata 20 microL/min, (c) con portata 50 microL/min, (d) con portata 100 microL/min.

Da queste rappresentazioni si vede come con una velocità di flusso bassa la diffusione dell'ossigeno sia molto marcata, infatti tende a distribuirsi ad assumere una concentrazione intermedia all'interno della camera, rendendo vano il tentativo di stabilire il gradiente che è presente solo per qualche millimetro all'inizio della camera. Aumentando la velocità, però, il fenomeno della convezione prevale su quello della diffusione e l'ossigeno ha una predisposizione sempre minore a diffondere in direzione dell'asse y.

Nei grafici riportati di fianco i surface plot si riproduce l'evolvere del profilo di concentrazione lungo tutta la camera per le quattro portate giudicate significative.

Sono stati scelti quattro punti differenti (1 mm, 2 mm, 7.5 mm e 15 mm dall'entrata) e sufficientemente lontani per meglio coprire tutta la lunghezza disponibile e attraverso l'operazione di post processing è stato ottenuto l'andamento del profilo di concentrazione lungo tutta la larghezza della camera nei punti definiti.

Dal confronto di questi grafici si evince come solamente con una portata minima di 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ sia garantita una certa linearità del gradiente lungo gli 1.5 mm di larghezza della camera e come, man mano che la portata cresce, la forma rimanga sempre più uniforme nello spazio, subendo sempre meno variazioni.

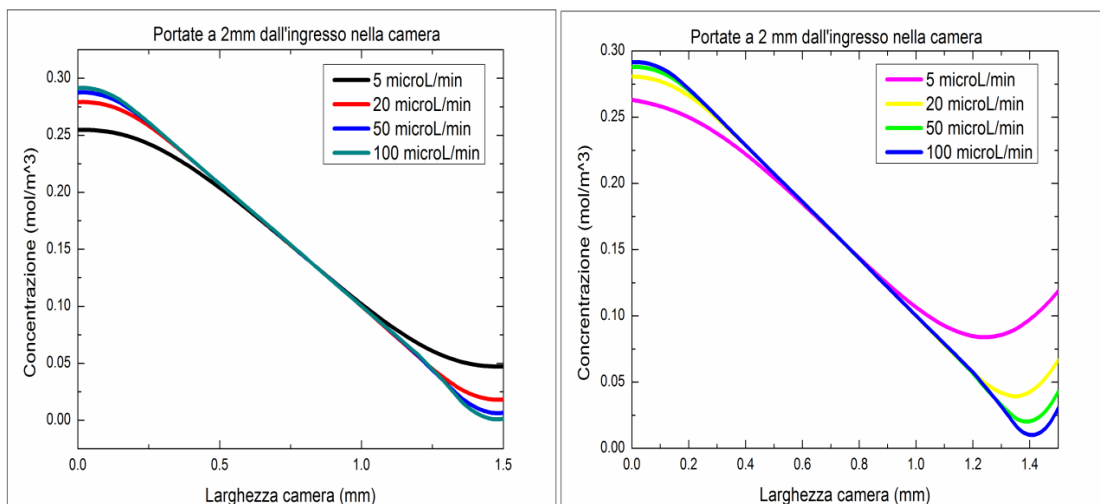
La causa di queste differenze di pendenza è la maggiore capacità che l'ossigeno ha di diffondere all'interno del liquido se la portata è bassa, portando ad una scomparsa quasi totale del profilo lineare che si era sviluppato all'inizio della camera, in un primo breve momento. Più la portata è alta più i profili tendono a sovrapporsi per un tratto sempre più ampio. Anche in questo caso sono riportati i grafici riferiti alla condizione ipossica di lavoro, mentre quelli della condizione normossica, che differiscono solamente perché hanno una forma speculare, sono in appendice A.

Dal confronto dei grafici di queste pagine, che riportano il profilo delle quattro diverse portate misurate nello stesso punto della camera, si deduce come all'inizio l'andamento nei diversi casi sia confrontabile, ma come già a metà camera per velocità basse la diffusione abbia un effetto pesante sulla concentrazione di ossigeno tanto che tende a uniformarla all'interno di tutto lo spazio disponibile, da qui il progressivo decadimento del profilo che porta ad un appiattimento della curva.

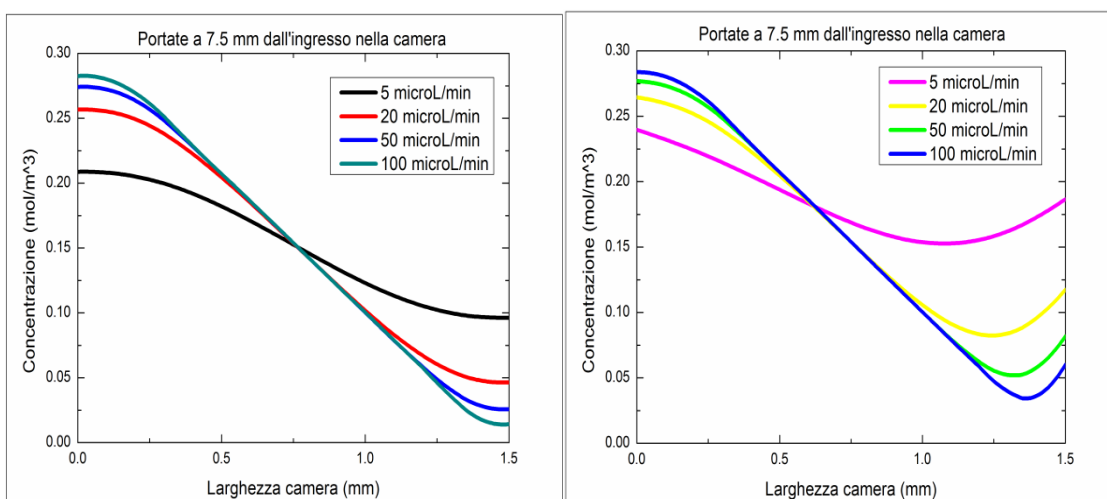
Vengono posti a confronto in Figura 3.9 i profili alla stessa altezza della camera.

Il primo grafico di ogni riga è riferito alla condizione ipossica, mentre il secondo è riferito alla condizione normossica dell'ambiente circostante il dispositivo.

(a)



(b)



(c)

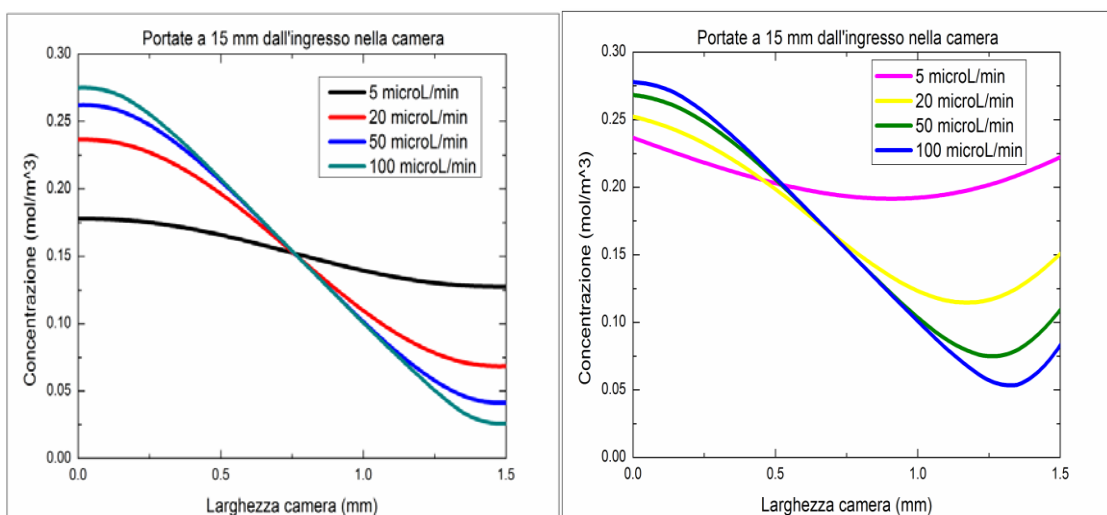
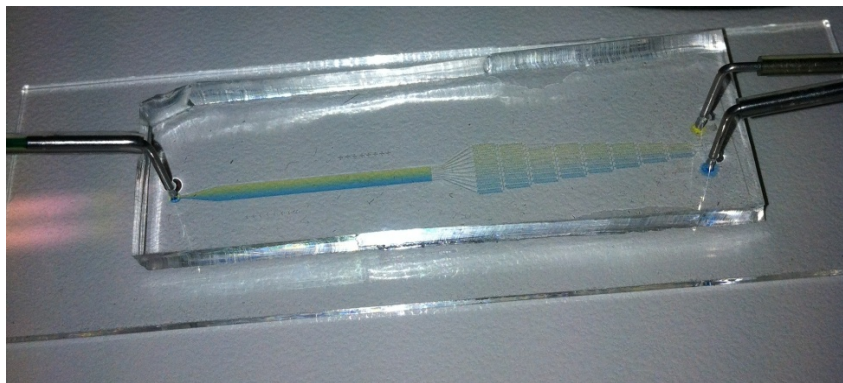


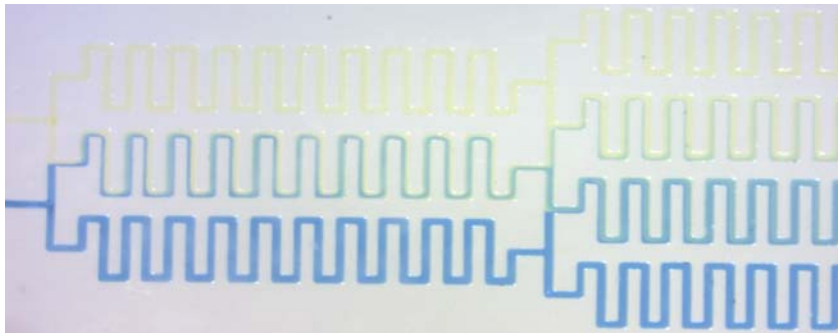
Figura 3.9. Grafici con andamento dei profili di concentrazione a (a) 2 mm dall'entrata nella camera (b) 7.5 mm dall'entrata e (c) 9 mm dall'entrata. Il primo grafico di ogni riga si riferisce alla condizione di 0% di ossigeno, mentre nel secondo al 21 %.

Ciò che si può notare è come la quantità di ossigeno presente in aria influenzi leggermente i valori della concentrazione di O_2 . Nel caso di presenza di un'atmosfera contenente il 21% di ossigeno tutti i profili sono spostati verso valori più alti di concentrazione rispetto ai profili nello stesso punto ma derivanti da un'atmosfera ipossica. Questo perché nel primo caso c'è un apporto continuo di sostanza che arricchisce la concentrazione già presente. Si nota inoltre, come sia indifferente lavorare in atmosfera al 21% di ossigeno o allo 0% di ossigeno, poiché in entrambe le situazioni il gradiente è lineare e ben definito.

Per verificare la presenza del gradiente, sono state effettuate delle prove con dei coloranti alimentari (blu e giallo). Alcune immagini sono riportate di seguito.



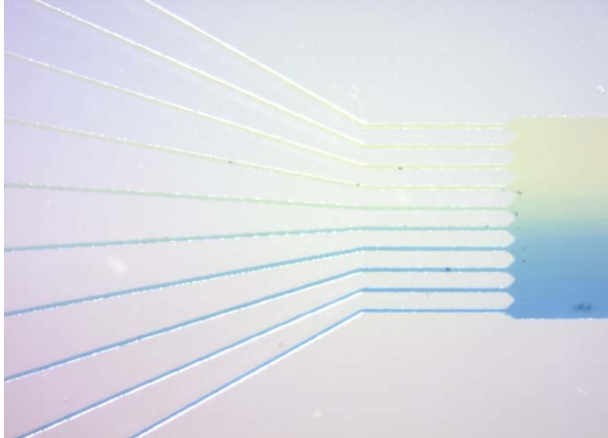
(a)



(b)



(c)



(d)



Figura 3.10. Immagine della prova di formazione del gradiente. (a) all'entrata dei canali (b) all'interno della camera (c) particolare dell'ingresso nella camera (d) particolare di una diramazione della stream.

3.5.1 Verifica del mantenimento del gradiente tramite fluorescenza

Per meglio confermare la forma e la disposizione del gradiente all'interno della camera di coltura si adopera la fluoresceina sodica in concentrazione 0.01%. La fluoresceina emette tra 520-530 nanometri. Per eseguire queste prove sperimentale è stato necessario utilizzare un microscopio a fluorescenza (*Leica*).

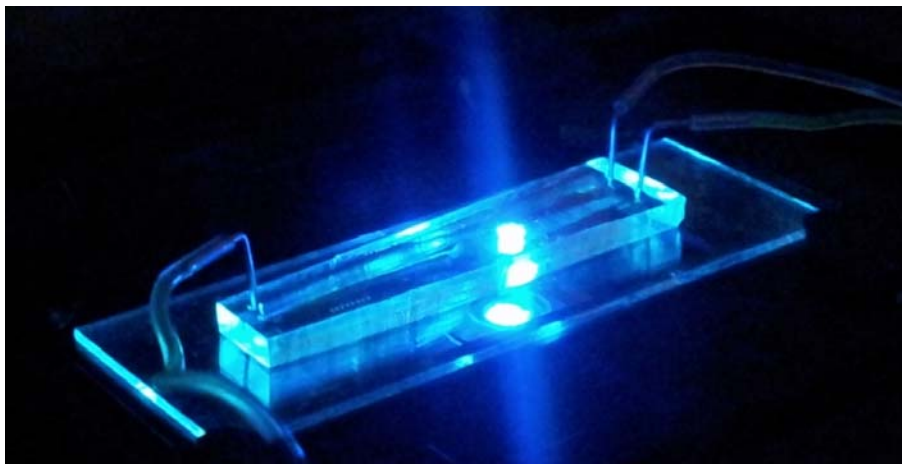


Figura 3.11. Immagine del chip all'interno del microscopio a fluorescenza.

Le diverse foto sono state fatte con differenti portate entranti nel sistema e per ognuna è necessario un tempo di assestamento, così da permettere al sistema di stabilizzarsi e di non risentire di eventuale sbalzi dovuti al cambiamento imposto di flusso.

La prima manovra è stata espellere tutte le bolle d'aria dal chip facendo confluire dell'acqua dalle due siringhe poste sulla pompa, ad una portata di 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Dopo aver tolto tutta l'aria ed aver riempito completamente il chip con il fluido, una siringa contenente acqua è stata sostituita con una contenente fluoresceina.

La variazione di portata dai 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ iniziali a 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ ha richiesto un tempo di assestamento abbastanza lungo, circa 30 minuti. Solo dopo questo intervallo è stato possibile considerare il sistema stabilizzato e quindi avviare la mesh. Il passo successivo è stato aumentare la portata ai 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, lasciando questa volta all'impianto una decina di minuti per stabilizzarsi. Man mano che la portata aumenta il tempo di riadattamento diminuisce: la portata di 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ richiede 5 minuti d'attesa, mentre quella massima considerata in questo lavoro, ovvero 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, solo 2 minuti.

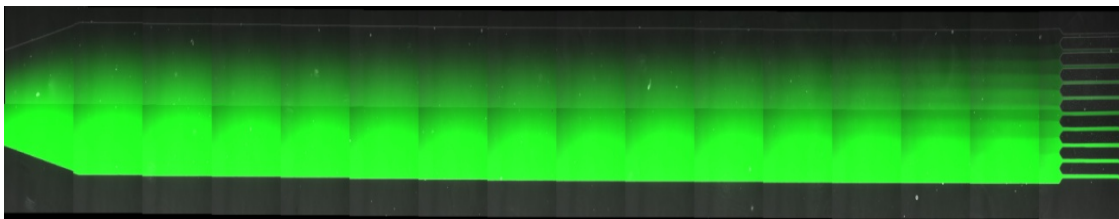


Figura 3.12. Foto della camera con una portata pari a 1 $\mu\text{l}/\text{min}$.

L'immagine precedente dimostra come, nonostante all'ingresso della camera le *stream* di alimentazione contengano tutte una diversa concentrazione di fluoresceina, esse si mantengono distinte solo nel primo breve tratto della camera, per poi convogliare e assumere una colorazione piuttosto costante lungo tutta la lunghezza della camera. Questo fenomeno è causato da una portata troppo bassa, influenzata da una velocità che non permette di mantenere in vita il gradiente che si forma solo per pochi millimetri all'entrata della camera. La diffusione prende il sopravvento sulla convezione dei due fluidi ed essi si mescolano, risultando di composizione intermedia tra i due iniziali.

È quindi necessario intervenire sulla velocità di flusso e lo si fa aumentando la portata direttamente sulla pompa a siringa. Ci si aspetta che, avendo un flusso più dinamico, il gradiente sia più visibile lungo la lunghezza della camera man mano che si aumenta la velocità.

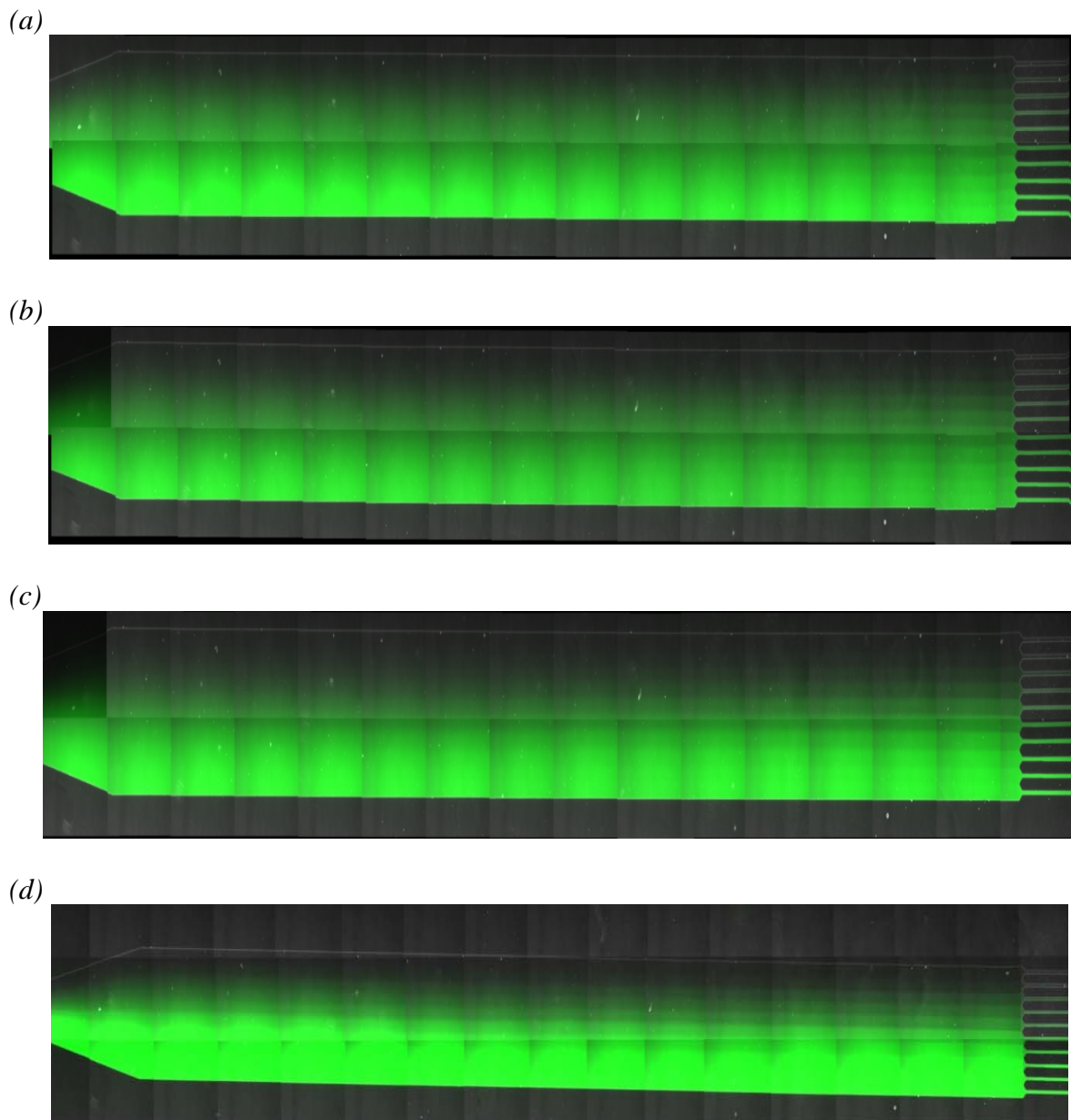


Figura 3.13. Foto della camera con diverse portate: (a) $5 \mu\text{l}/\text{min}$ (b) $10 \mu\text{l}/\text{min}$ (c) $20 \mu\text{l}/\text{min}$ (d) $50 \mu\text{l}/\text{min}$.

I risultati attesi sono confermati, infatti man mano che si alza la portata le righe in entrata sono sempre più presenti lungo la lunghezza della camera. A portate molto basse la diffusione prende il sopravvento, facendo scomparire quasi subito la differenza di concentrazione iniziale tra le *streams*.

Solamente nell'immagine (d) le diverse colorazioni sono ben definite lungo tutta la lunghezza disponibile, questo conferma i risultati teorici derivanti dalle simulazioni secondo cui 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ è la minima portata da adottare per avere in gradiente di concentrazione costante.

Nella prossima figura viene riportato l'ingresso nei canali: visibile è la distinzione tra le diramazioni in entrata, quello più in alto non si vede perché è completamente riempito d'acqua pura mentre scendendo verso il basso la concentrazione di fluoresceina aumenta sempre più fino alla terza *stream* all'interno della quale la percentuale d'acqua è 0%.



Figura 3.14. Particolare della diramazione dei canali all'ingresso.

In figura 3.18 si riportano i valori dell'intensità della fluorescenza riferiti a 3 diverse sezioni della camera (alta 1.5 mm). I profili sono stati plottati con un intervallo costante di 7.5 mm, a partire dal punto d'ingresso.

La seguente figura rappresenta le disposizioni delle diverse altezze all'interno della camera, scelte in modo da avere una visuale il più completa possibile del comportamento del fluido lungo tutta la lunghezza.

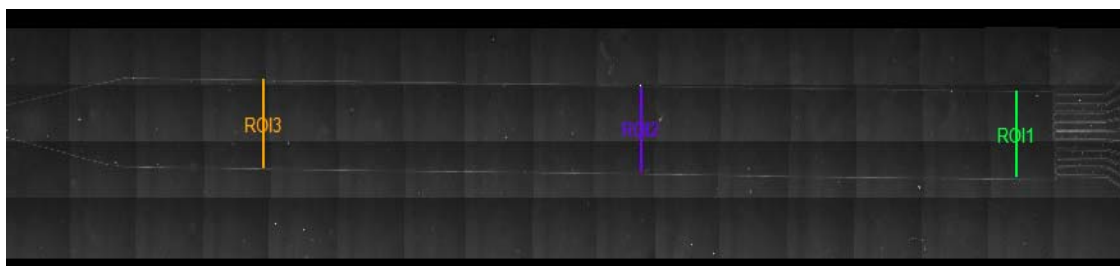


Figura 3.15. Altezze significative all'interno della camera.

Il grafico riportato è riferito alla portata più alta utilizzata, 50 $\mu\text{l}/\text{min}$.

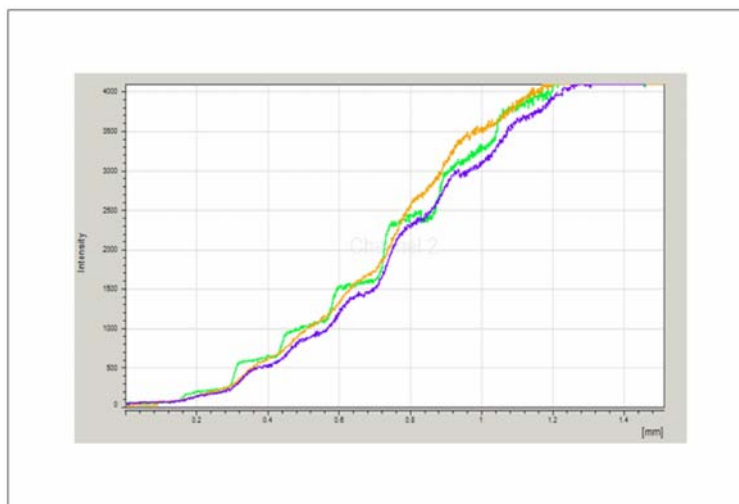


Figura 3.16. *Profili di concentrazione all'interno della camera alle 3 distanze. Il verde rappresenta RO11, il viola RO12 e il giallo RO13.*

Si può notare come all' inizio della camera l'intensità abbia un profilo a gradini ben distinti, segno che c'è una differenza di concentrazione di fluoresceina all'interno delle varie *streams* d'ingresso molto marcata.

Man mano che ci si allontana dall'ingresso la curva dell'intensità risulta avere un profilo sempre più lineare, infatti l'acqua e la fluoresceina subiscono un progressivo mescolamento. I gradini così marcati all'inizio, però, sono sempre presenti: il profilo di concentrazione è mantenuto lungo tutta la camera perchè la differenza di concentrazione dovuta ai 10 ingressi differenti viene conservata lungo tutta la lunghezza. In appendice B si allegano i profili di intensità alle stesse altezze, ma alle altre portate.

Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato sviluppato un dispositivo microfluidico per la generazione di un gradiente di ossigeno costante e stabile nel tempo all'interno di una camera di coltura cellulare.

Attraverso tecniche di soft-litografia è stato prodotto un chip multistrato formato da uno strato spesso e uno strato sottile.

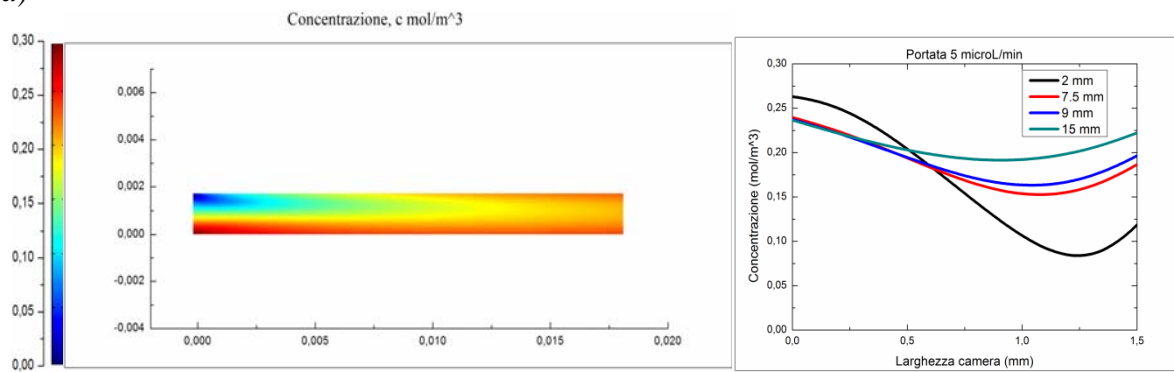
Lo strato spesso è responsabile della generazione del gradiente, ed è separato dalla camera di coltura attraverso una membrana sottile. Il gradiente si trasferisce alla camera attraverso la permeazione dell'ossigeno attraverso la membrana di separazione. Analizzando i profili di concentrazione all'interno della camera di coltura, ottenuti dalle simulazioni computazionali, risulta più conveniente utilizzare un dispositivo che permetta di ottenere un gradiente lineare di concentrazione. un numero di ingressi basso. È emerso inoltre che lo scambio di ossigeno dalla zona del gradiente alla zona di coltura non sia particolarmente influenzato dallo spessore della membrana, che può avere indifferentemente un'altezza compresa tra i 10 e i 100 micron. Dalle simulazioni emerge che la generazione del gradiente dipende dalla portata del liquido. La portata dovrà essere superiore ai 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La solidità e la capacità di generare un gradiente stabile nel tempo è stata verificata tramite prove sperimentali.

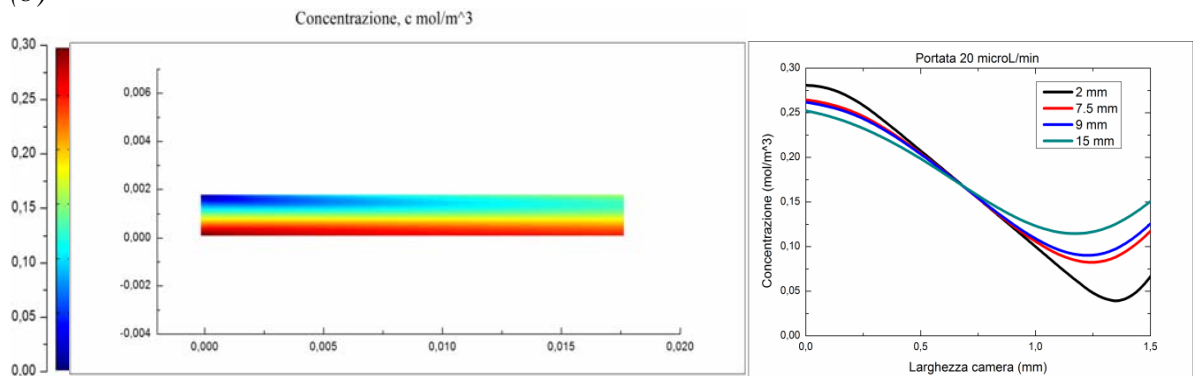
Appendice A

In questa appendice sono riportate le immagini delle simulazioni della camera di generazione del gradiente quando essa è sottoposta ad un costante apporto di ossigeno proveniente dall'atmosfera esterna, contenente il 21% di ossigeno.

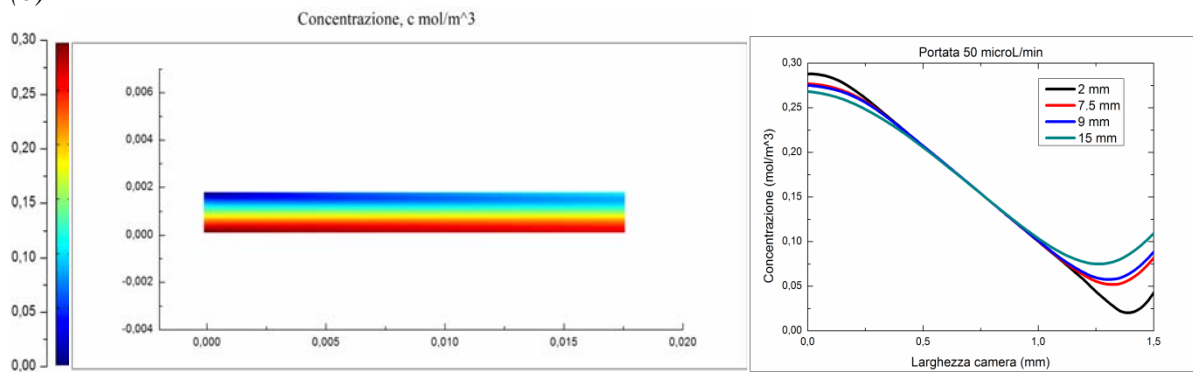
(a)



(b)



(c)



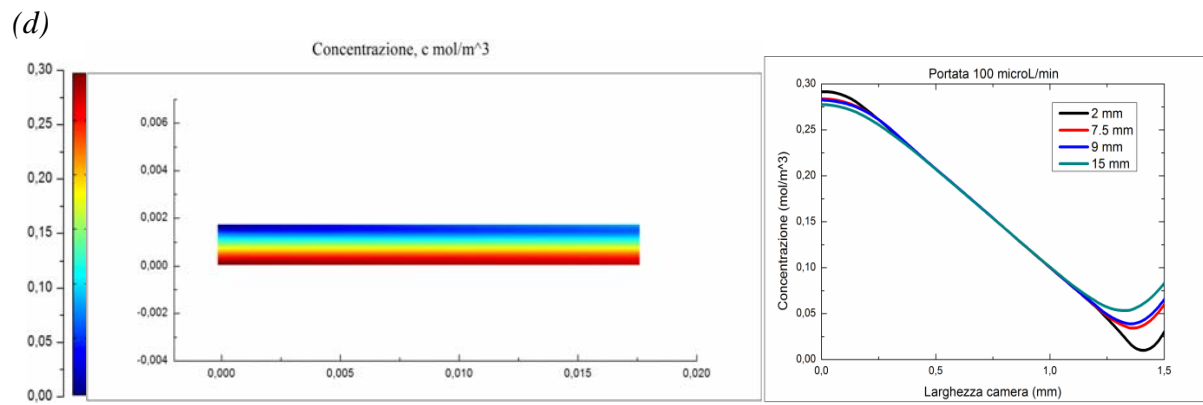


Figura A1. Immagini delle simulazioni della camera. (a) portata 5 microL/min, (b) portata 20 microL/min, (c) portata 50 microL/min, (d) portata 100 microL/min.

Appendice B

Di seguito si riportano i grafici dell'intensità della fluorescenza alle altre portate utilizzate, 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

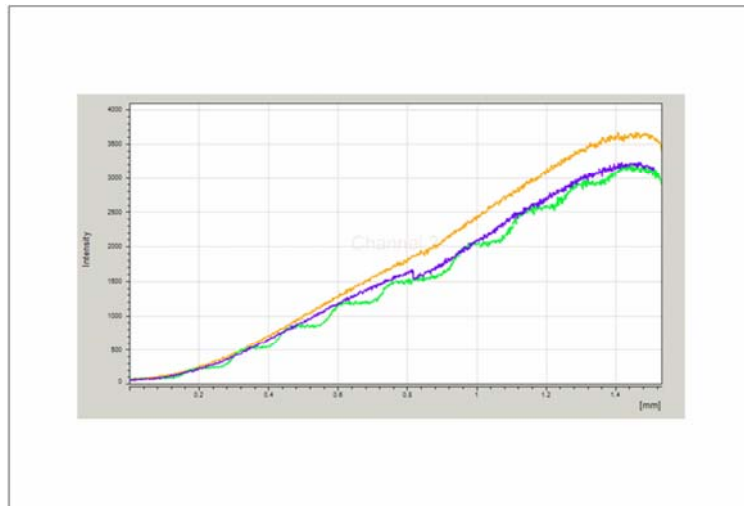


Figura B.1 Intensità della fluorescenza all'interno della camera alle 3 distanze con portata di 5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

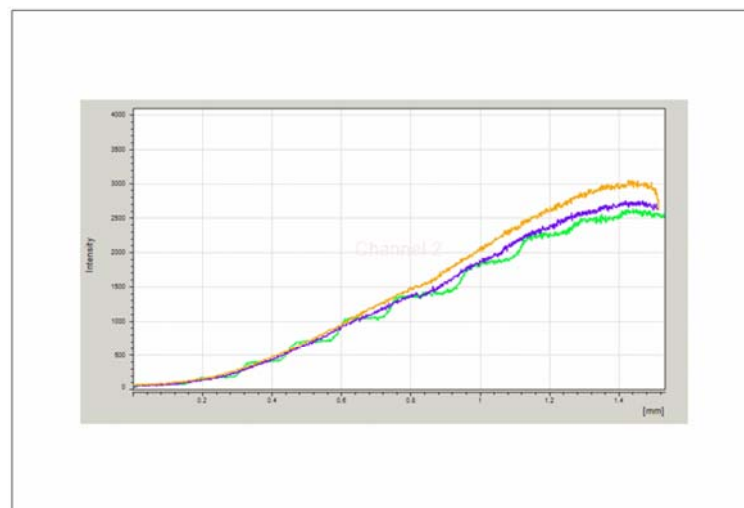


Figura B.2 Intensità della fluorescenza all'interno della camera alle 3 distanze con portata di 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

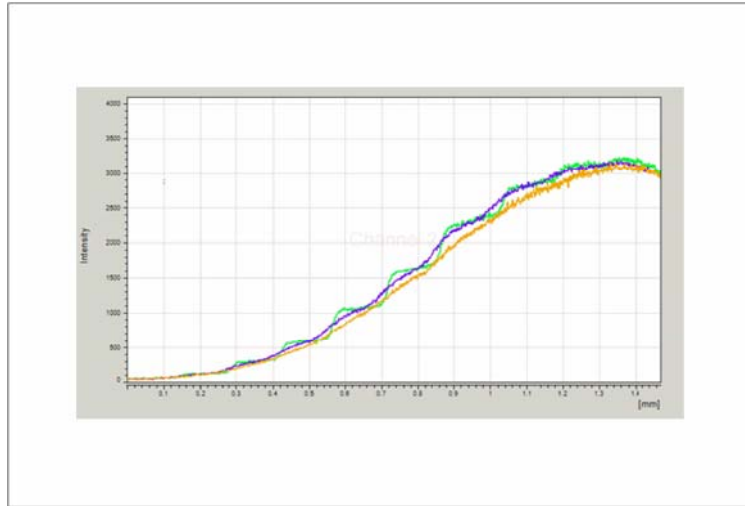


Figura B.3 *Intensità della fluorescenza all'interno della camera alle 3 distanze con portata di 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.*

Riferimenti bibliografici

- Abaci H., R. Devendra, Q. Smith, S. Gerecht, G. Drazer ‘ *Design and development of microbioreactors for long-term cell culture in controlled oxygen microenvironments*’, (2011).
- Abdelgawad M., M. Watson, E. Young, J. Mudrik, M. Ungrin and A. Wheeler ‘ *Soft Lithography: masters on demand*’, (2008).
- Adler M., Mark P., E. Gutierrez and A. Groisman ‘ *Generation of oxygen gradients with arbitrary shapes in a microfluidic device*’, (2009).
- Beebe D.J., Mensing G.A., and Walker G.M. (2002). ‘ *Physics and applications of microfluidics in biology.*’ *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4: 261-286
- Chung B.G. and Choo J., ‘ *Microfluidic gradient platforms for controlling cellular behavior*’, (2010).
- Dertinger S., D. Chiu, N. Li Jeon and G. Whitesides ‘ *Generation of gradient having complex shapes using microfluidic networks*’, (2001).
- Jeon N. Li, S. Dertinger, D. Chiu, I. Choi, A. Stroock and G. Whitesides ‘ *Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems*’, (2000).
- Kim et al., ‘ *Integrative biology*’, (2010).
- Kuncová-Kallio J. and P. Kallio, ‘ *PDMS and its suitability for analytical microfluidic device*’, (2006).
- Martewicz s., F. Michielin, E. Serena, A. Zambon, M. Mongillo, N. Elvassore, ‘ *Reversible alteration of calcium dynamics in cardiomyocytes during acute hypoxia transient in a microfluidic platform*’, (2011).
- Michielin F., ‘ *Sviluppo di una piattaforma microfluidica per il controllo della concentrazione di ossigeno in colture cellulari*’, (2010).

Muschler G.F., C. Nakamoto and Griffith L.G., '*Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering*', (2004).

Perry Robert, '*Chemical Engineer's Handbook*', 7th edition.

Prevedello L., '*Strategie per la gestione di colture cellulari in microbio reattori durante il volo spaziale*', (2010).

Skolimowski M., M. Nielsen, J. Emnèus, S. Molin, R. Taboryski, C. Sternberg, M. Dufva and O. Geschke '*Microfluidic dissolved oxygen gradient generator biochip as a useful tool in bacterial biofilm studies*', (2010).

Welty, Wicks, Wilson, Rorrer, '*Fundamentals of momentum, heat and mass transfer*', 5th edition.

Xia Y. and G. Whitesides '*Soft lithography*', (1998).

Zambon A., '*Sviluppo e fabbricazione di una piattaforma microfluidica multistrato per il controllo di colture cellulari microstrutturate*', (2009).

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare prima di tutto il Prof. Nicola Elvassore, che mi ha permesso di effettuare il tirocinio nel suo laboratorio e mi ha affidato un argomento tanto interessante. Oltre ad Alessandro che mi ha dato una grossa mano in questi mesi, in particolare con la stesura della tesi, vorrei ringraziare tutto il laboratorio Bioera per aver risolto sempre ogni mio dubbio, soprattutto Enrico che ha perso delle ore a capire quale fosse il problema delle simulazioni.

Grazie ai miei genitori Nadia e Giorgio che mi hanno sopportato in questi ultimi mesi difficili, ma lo fanno da una vita....Grazie a mio fratello Nicola che ha un suo modo di starmi vicino, anche se non ha ancora capito cosa studio. Grazie al mio ragazzo Enrico che, pur essendo lontano, ha sopportato le mie telefonate infinite, ciao Amo! Grazie ai miei nonni e ai miei zii, in particolare a mia nonna Maria che da lassù mi sorveglia ogni giorno.

Un grazie di cuore a tutte le Contromano perché senza di loro darei persa. La Tiù, per tutti i pomeriggi passati a 'studiare assieme al terzo' ed essermi amica da una vita. Isa, Marta e Lau, care quinquiline per aver sopportato il mio disordine in casa, e non solo... La Vale per i suoi 150 sms al giorno così, per sentire come stai e Ste che non si arrabbia mai, qualunque cosa tu faccia. Non so come farei senza di voi! Grazie a tutte le amiche del liceo Giulia, Elisa, Veronica e Camilla con cui ho trascorso cinque anni indimenticabili. Ringrazio le mie amiche di pallavolo Irene, Sara e Michela. Con voi gli allenamenti sono stati fenomenali! Voglio ringraziare anche le mie compagne di corso Chiara, Angela, Francesca e Rachele perché con loro andare a lezione era (quasi) sempre uno spasso.

Grazie di cuore a tutti, anche chi non è stato citato per le avventure passate e quelle future che sicuramente accadranno. Grazie a tutti per aver contribuito diventare la persona che sono.

Martina

