



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTA' DI INGEGNERIA

Corso di Laurea triennale in INGEGNERIA BIOMEDICA

Lab-on-chip per lo studio della chemiotassi su pazienti affetti da sindrome di Shwachman-Diamond

Lab-on-chip for studying chemotaxis in Shwachman-Diamond Syndrome patients

Relatore:

Prof.ssa Laura Burattini

Tesi di Laurea di:

Camilla Ceccolini

Correlatore:

Dott. Valentino Bezzeri

A.A. 2020 / 2021

*A Iolanda,
anche se in ritardo,
spero tu sia orgogliosa di me.*

SOMMARIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUZIONE | 1 |
| 1.1 | SINDROME DI SHWACHMAN-DIAMOND..... | 1 |
| 1.1.1 | <i>Alterazioni della chemiotassi dei leucociti osservate nella SDS.....</i> | <i>2</i> |
| 1.1.2 | <i>Ataluren</i> | <i>4</i> |
| 1.2 | LAB-ON-CHIP | 4 |
| 1.2.1 | <i>Leggi di Fick.....</i> | <i>7</i> |
| 2 | SCOPO DELLA TESI | 9 |
| 3 | MATERIALI E METODI | 9 |
| 3.1 | MATERIALI GENERALI | 9 |
| 3.2 | POLIDIMETILSILOSSANO | 9 |
| 3.3 | PROGETTO DI LAVORO | 11 |
| 3.4 | PROCEDURA DI FABBRICAZIONE DEL CHIP | 11 |
| 3.4.1 | <i>Litografia.....</i> | <i>11</i> |
| 3.4.2 | <i>Trattamento al plasma e thermal bonding</i> | <i>16</i> |
| 3.4.3 | <i>DISPOSITIVI UTILIZZATI.....</i> | <i>19</i> |
| 3.5 | LAB-ON-CHIP | 20 |
| 3.5.1 | <i>Equilibratura</i> | <i>20</i> |
| 3.5.2 | <i>Utilizzo di campioni biologici umani.....</i> | <i>21</i> |
| 3.5.3 | <i>Preparazione delle cellule e dello stimolo</i> | <i>22</i> |
| 3.5.4 | <i>Preparazione del chip per il run</i> | <i>22</i> |
| 3.5.5 | <i>Acquisizione del run.....</i> | <i>23</i> |
| 3.5.6 | <i>Analisi dei dati.....</i> | <i>23</i> |
| 4 | RISULTATI | 26 |
| 4.1 | FOTOLITOGRAFIA I E II LIVELLO | 26 |
| 4.2 | LITOGRAFIA SOFFICE..... | 26 |
| 4.3 | TRATTAMENTO AL PLASMA..... | 27 |
| 4.4 | SET UP DEL DEVICE | 27 |
| 4.5 | CHEMOTAXIS ON CHIP | 29 |
| 5 | DISCUSSIONE E CONCLUSIONI | 31 |
| | BIBLIOGRAFIA | 35 |

1 INTRODUZIONE

1.1 SINDROME DI SHWACHMAN-DIAMOND

La sindrome Shwachman-Diamond (SDS) è una malattia genetica rara, autosomica recessiva, causata nella maggior parte dei casi da mutazioni bialleliche del gene *SBDS*, collocato sul cromosoma 7¹. Tuttavia, in rari casi, anche altri geni sono stati recentemente associati a SDS, tra i quali *EFL1*, *eIF6*, *SRP54* e *DNAJC21*². È importante notare che tutti questi geni sono coinvolti nella biogenesi dei ribosomi. In particolare, la proteina SBDS collabora con il suo partner molecolare EFL1 nella maturazione del ribosoma eucariotico 80S, facilitando il rilascio della proteina eIF6 e consentendo l'assemblaggio delle subunità 60S e 40S³⁻⁵. Le proteine SBDS, EFL1 ed eIF6 sono tutte localizzate nella subunità maggiore del ribosoma. L'interazione corretta tra le proteine codificate da questi geni è necessaria affinché si generino distorsioni molecolari in grado di consentire il rilascio della proteina eIF6⁶. Ne deriva che, nel caso in cui una di queste proteine mancasse o non fosse funzionale a causa di mutazioni genetiche, il processo di assemblaggio del ribosoma verrebbe gravemente compromesso. Per questo motivo, la SDS è stata definita una ribosomopatia⁴. Ad oggi sono note circa 20 mutazioni di *SBDS*. Una delle varianti patologiche di *SBDS* più frequenti è la mutazione nonsense c.183-184-TA>CT, nella quale un codone di stop viene inserito prematuramente nella sequenza codificante, portando alla generazione di una proteina tronca, non funzionante e alla rapida degradazione del mRNA mutato da parte del meccanismo di controllo cellulare noto come *nonsense mediated decay* (NMD).

L'incidenza della SDS nella popolazione è stata stimata in 1 caso ogni 75000 nati vivi⁷. Il registro italiano dei pazienti SDS conta ad oggi circa 130 casi.

La SDS è una malattia multiorgano, che colpisce midollo osseo, ossa, denti, fegato, pancreas e cervello. In questa tesi verrà affrontata nel dettaglio l'insufficienza del midollo osseo ed i problemi ematologici legati ad essa. La SDS è considerata una sindrome mielodisplastica (*myelodysplastic syndromes*, MDS)⁸. Le mielodisplasie sono causate dalla mancata corretta maturazione delle cellule staminali ematopoietiche del midollo osseo, che in genere porta a citopenia nel torrente ematico. Ne deriva che le MDS siano caratterizzate da anemia, piastrinopenia e neutropenia. In particolare, la SDS è caratterizzata da neutropenia grave, riscontrabile in gran parte dei pazienti, mentre sono meno frequenti i casi di anemia e piastrinopenia. Le MDS sono riscontrate più frequentemente nella popolazione anziana, con età superiore ai 70 anni di età. Tuttavia, alcune predisposizioni genetiche, quali la SDS e altre ribosomopatie, come l'anemia di Diamond-Balckfan (DBA) e la discheratosi congenita (DC), sono caratterizzate da MDS giovanile. Infatti, i pazienti affetti da SDS mostrano un rischio di evoluzione in MDS del 8,1% a 10 anni, e del 36% a 30 anni⁹. Il principale problema legato alla MDS è l'elevato rischio di evoluzione in leucemia mieloide acuta (AML), che è aumentato di circa 1000 volte rispetto alla popolazione generale. Secondo i dati forniti dal registro francese delle

neutropenie gravi croniche e dal registro italiano dei pazienti SDS, circa il 12% dei pazienti con SDS seguiti nei rispettivi registri hanno sviluppato MDS giovanile o AML⁹. Non è ancora noto il meccanismo molecolare che sottintende al processo oncogeno riscontrato nelle ribosomopatie, ma lo stress cellulare indotto dall'iperattivazione di specifiche *pathways* quali *mammalian target of rapamycin (mTOR)* e *tumor protein 53 (TP53)*, oppure l'esagerato rilascio di citochine mielosoppressive, o ancora l'attivazione di proteine oncogene quali STAT3 e STAT5, sono attualmente considerati fattori importanti nel processo di evoluzione in MDS/AML.

1.1.1 Alterazioni della chemiotassi dei leucociti osservate nella SDS

La chemiotassi consiste nella migrazione direzionata delle cellule verso uno stimolo chimico.

Nei pazienti SDS la capacità chemiotattica è quasi totalmente persa e questo provoca seri problemi dal punto di vista della risposta immunitaria innata. I granulociti neutrofili (polimorfonucleati, PMN), infatti, rappresentano la popolazione cellulare più efficace e numerosa tra quelle coinvolte nella risposta cellulomediata, diretta contro le infezioni batteriche. I PMN sono in grado di agglomerarsi rapidamente nel sito dell'infiammazione, dove rilasciano il contenuto dei loro granuli, contenenti enzimi ad elevata attività ossidativa (es. mieloperossidasi) e proteolitica (elastasi, proteasi). La velocità e la persistenza direzionale sono proprietà dinamiche solitamente utilizzate per caratterizzare la chemiotassi dei neutrofili. La velocità di migrazione di un neutrofilo è di circa 1–20 $\mu\text{m} / \text{min}$, ma può variare in base allo stimolo chemiotattico. In vivo, lo stimolo chemiotattico principale per i neutrofili è rappresentato dalla chemochina Interleuchina (IL)-8. La persistenza direzionale indica il rapporto tra lo spostamento relativo attraverso il gradiente chemiotattico (direzione) e la lunghezza totale del percorso migratorio.

Il reclutamento dei neutrofili nel sito di infezione avviene in diverse fasi: cattura del neutrofilo circolante nel torrente ematico a seguito del legame selectina-ligando (es. *P-selectin glycoprotein ligand-1*), *rolling*, arresto cellulare mediato dal legame integrina-ligando, transmigrazione attraverso l'endotelio e migrazione verso il bersaglio finale tramite chemochinesi e chemiotassi (figura 1)¹⁰.

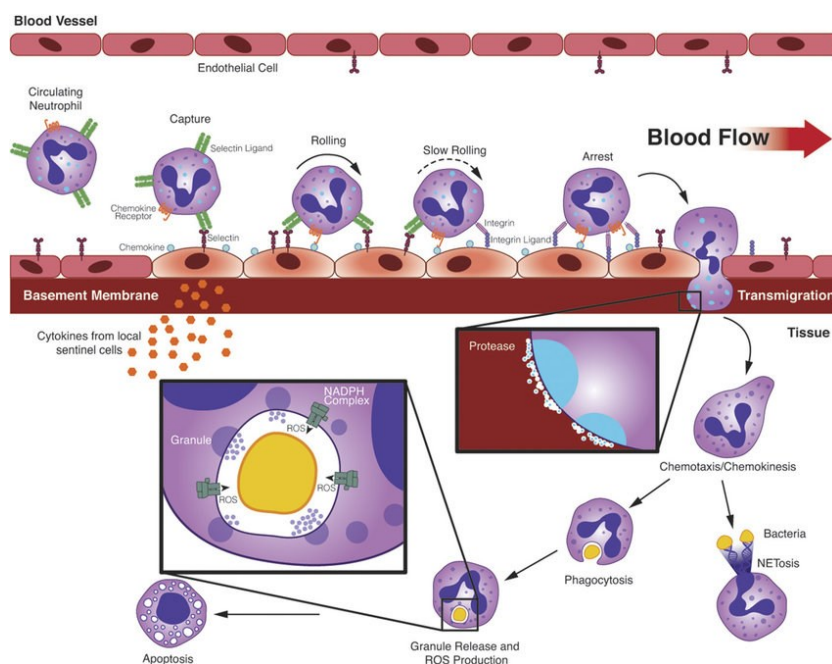


Figura 1- Fasi del reclutamento del granulocita neutrofilo nel sito di infezione (Caster et al, J Am Soc Nephrol, 2017. DOI: 10.1681/ASN.2016121271)

Il modello chemiotattico tradizionale è rappresentato da una sorgente che rilascia un chemioattrattore nell'ambiente, mentre un fulcro distante lo assorbe, formando un gradiente di diffusione che può dirigere la migrazione cellulare. Una volta che il chemiotattico interagisce con il suo recettore, il neutrofilo subisce un riarrangiamento del citoscheletro, cambiando la forma e quindi polarizzandosi. Uno pseudopodio viene estroflesso nella parte anteriore spingendo la cellula in avanti, mentre si sviluppa una estremità posteriore che consente al granulocita di migrare lungo il gradiente di concentrazione di stimolo chemiotattico ¹⁰.

Proprio nel meccanismo di riarrangiamento delle fibre del citoscheletro risiede una delle probabili cause del deficit di chemiotassi osservato nelle cellule SDS. La chemiotassi dei neutrofili dipende infatti dalla polimerizzazione e depolarizzazione dei microfilamenti del citoscheletro. I neutrofili dei pazienti SDS presentano una forte alterazione della capacità di polimerizzazione dei filamenti di f-actina, che non consente un corretto movimento direzionale dei neutrofili in seguito al riconoscimento del gradiente chemiotattico ¹¹.

È stato inoltre riportato in esperimenti in vitro, che i neutrofili SDS sottoposti ad un gradiente chemiotattico generato con N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) presentano aumento della velocità, diminuzione del cambiamento direzionale, e diminuzione della frequenza di formazione di pseudopodi rispetto a neutrofili isolati da soggetti sani di controllo ¹².

1.1.2 Ataluren

Al momento non esistono terapie farmacologiche in grado di contrastare l'insufficienza midollare nei pazienti affetti da SDS. L'unica opzione terapeutica rimane il trapianto di cellule midollari staminali ematopoietiche. Inoltre, la AML è caratterizzata da forte resistenza ai trattamenti chemioterapici. Ne deriva che vi sia un urgente bisogno di sviluppare terapie innovative preventive in grado di rallentare o arrestare l'insorgenza di MDS e AML. Circa il 50% dei pazienti SDS presenta la mutazione nonsense c.183-184-TA>CT in un allele, mentre il secondo allele generalmente mostra una mutazione di *splicing*, cioè la variante c.258+2T>C. Negli ultimi dieci anni sono state sviluppate diverse strategie farmacologiche atte a sopprimere le mutazioni nonsense. Una strategia è quella di ridurre il decadimento del mRNA mutato mediato dal meccanismo cellulare NMD. Un altro approccio è quello di sviluppare molecole in grado di generare il *readthrough* del codone di stop prematuro (*premature termination codon*, PTC), reclutando un t-RNA al posto del fattore di terminazione della traduzione (*eukaryotic translation termination factor 1*, eRF1). In merito a questa seconda strategia, la molecola Ataluren, anche definita PTC-124 (3-[5-(2-fluorophenyl)-[1,2,4]oxadiazol-3-yl]-benzoic acid) ha mostrato dati convincenti nel ripristinare l'espressione genica di distrofina nei pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne (DMD). Ataluren, commercializzato con il nome di Translarna®, è quindi stato approvato dalla *European Medicines Agency* (EMA) per l'uso nei pazienti con DMD¹³. Ataluren è una piccola molecola biodisponibile in grado di generare *readthrough* dei PTC con un'efficienza dipendente dalla sequenza del codone di stop stesso. Ataluren predilige la correzione del codone UGA, seguito dalle altre due varianti di sequenza di stop, UAG e UAA^{14,15}. Questo fatto suggerisce che non tutte le mutazioni nonsense possono essere corrette allo stesso modo da Ataluren. La maggior parte delle malattie ereditarie è caratterizzata da molteplici mutazioni nonsense che possono colpire lo stesso gene, generando quindi uno spettro di possibilità in termini di efficienza di soppressione della mutazione da parte del farmaco. Fortunatamente, la mutazione nonsense del gene *SBDS* riscontrata nella maggior parte dei pazienti SDS è la c.183-184TA>CT, che inserisce un codone di stop UGA, facilitando perciò il processo di *readthrough* da parte di Ataluren. Il gruppo di ricerca coordinato dal Dott. Bezzerri e dal Dott. Cipolli ha recentemente mostrato che Ataluren è in grado di ripristinare l'espressione del gene *SBDS* in progenitori ematopoietici del midollo osseo (*bone marrow mononuclear cells*, BM-MNC) e in cellule mesenchimali stromali (BM-MS). Inoltre, attraverso l'uso di *colony assays*, è stato osservato che il ripristino di espressione di *SBDS* ha portato all'aumento della maturazione delle colonie mieloidi (GM-CFU) ed alla riduzione dei livelli di fosforilazione della proteina mTOR¹⁶.

1.2 LAB-ON-CHIP

I Lab-on-Chip (LoC) sono stati sviluppati per la prima volta nel 1960, combinando concetti di biologia cellulare, tecnologia dei biomateriali e microfluidica. Il principale vantaggio dato dall'utilizzo dei LoC è la possibilità di utilizzare volumi ridotti di materiale biologico e di reagenti (nell'ordine di nL o µL).

Grazie a questi nuovi dispositivi vengono superate alcune delle limitazioni dei metodi di analisi di chemiotassi tradizionali.

Alcuni esempi di metodi di analisi di chemiotassi tradizionali più comuni sono la “Camera di Boyden” e la “Camera di Zigmond”, la quale è una evoluzione della prima.

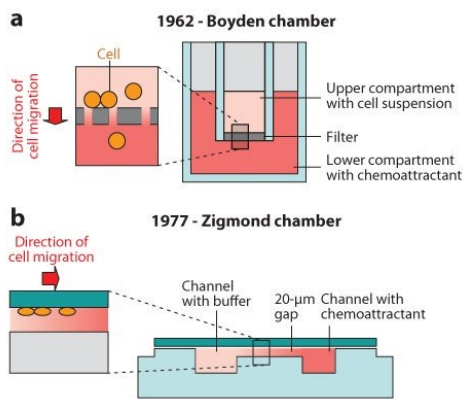


Figura 2- (a) Camera di Boyden, (b) Camera di Zigmond ¹⁷.

La “Camera di Boyden”(figura 2a) è composta da due camere separate da un filtro; in quella superiore sono collocate le cellule, mentre in quella inferiore viene messo il fluido che contiene lo stimolo chemiotattico. Le principali limitazioni di questo metodo sono che esso è inadatto per osservare le risposte della singola cellula, vengono creati dei profili di gradiente instabili e non è possibile distinguere la chemiotassi dalla chemochinesi.

Per osservare le cellule in *real-time*, è stata successivamente sviluppata la “Camera di Zigmond”(figura 2b), che rappresenta un primo prototipo di dispositivo basato sulla microfluidica. In questo dispositivo vi sono due camere collegate tramite un ponte. Il gradiente di concentrazione è sviluppato sul ponte, nel quale viene poi contato il numero di cellule migranti che lo attraversano ^{18,19}. La limitazione principale della Camera di Zigmond è che le caratteristiche chimico-fisiche del gradiente sono determinate dalla geometria del dispositivo ed è estremamente sensibile all’evaporazione. Inoltre, una volta che le soluzioni vengono caricate nelle camere, il gradiente non può essere modificato.

Altre limitazioni dei sistemi di analisi di chemiotassi tradizionali includono lo schiacciamento delle cellule durante l’assemblaggio di questi sistemi, con il conseguente rilascio di fattori cellulari che potrebbero inficiare sulla funzione chemiotattica, l’elevato consumo di reagenti e, infine, la mancata riproduzione delle caratteristiche fisiologiche e biologiche che si potrebbero osservare *in vivo*.

Negli ultimi decenni sono stati progettati sistemi per lo studio della chemiotassi sempre più raffinati basati sulla microfluidica, che presentano diversi vantaggi rispetto ai metodi tradizionali. Alcuni esempi di vantaggi relativi all'uso di sistemi microfluidici sono i seguenti:

- il risparmio dei reagenti, in quanto i volumi usati sono dell'ordine dei nl o μl ;
- lo studio del comportamento della singola cellula, in *real-time*;
- il controllo dei parametri del sistema: ossigeno, pH, profili del gradiente di concentrazione, etc;
- la possibilità di osservare fenomeni di chemochinesi e chemiotassi, dove la prima si riferisce alla velocità di spostamento della cellula, mentre con la seconda si intende lo spostamento della cellula verso un chemioattrattore, in particolare la capacità direzionale della cellula.

I dispositivi microfluidici per lo studio di chemiotassi possono essere distinti in due principali tipologie: basati sul flusso e senza flusso. I primi sono dotati di un flusso controllato, per stabilire i profili di gradiente richiesti. Questi sono prodotti a basso numero di Reynolds, con flusso laminare e direzione perpendicolare a quella del flusso. La direzione del flusso di fluido è concorde con il canale, mentre la direzione chemiotattica dei neutrofilo è perpendicolare ad esso. Elemento penalizzante di questa tipologia è che i neutrofilo sono sottoposti costantemente alle forze di taglio e con il continuo flusso vengono lavati via i fattori autocrini e paracrini rilasciati dalle cellule, influenzando il comportamento dei neutrofilo durante la chemiotassi.

Per il nostro progetto è stato usato un dispositivo microfluidico in condizioni statiche, in cui la generazione del gradiente è basata sulla diffusione chimica dello stimolo. In questi dispositivi privi di flusso, viene minimizzato l'effetto delle forze di taglio sulle cellule. Una limitazione dei dispositivi in statica è rappresentata dalla difficoltà nel creare profili di gradiente complessi. Inoltre, il gradiente generato in statica è utilizzabile solo fino al raggiungimento dell'equilibrio di concentrazione.

I dispositivi senza flusso possono essere classificati in tre tipologie: dispositivi basati su microscanalature, dispositivi basati su membrane e dispositivi basati su *hydrogel*. Per quelli a membrana e a base di *hydrogel*, le membrane e il gel vengono utilizzati come barriere fisiche per controllare la diffusione chimica e separare la camera di generazione del gradiente e la camera di flusso del fluido. Pertanto, l'effetto di taglio nella generazione del gradiente è minimo¹⁰.

Per questo progetto la scelta è ricaduta su un dispositivo basato su microscanalature, strutturato da canali paralleli collegati da microscolchi disposti perpendicolarmente ad essi.

Ci sono vari modi di sfruttare le scanalature per generare il gradiente. Saadi e colleghi, ad esempio, hanno generato i gradienti nelle microscanalature che collegano 2 canali paralleli. Siccome i microcanali hanno dimensioni circa 10 volte più piccole dei macrocanali, in essi si crea una resistenza fluidica decisamente

maggiore che limita il flusso del fluido nei canali paralleli. Di conseguenza il principale metodo di trasporto in questa situazione è la diffusione ¹⁰.

Keenan e colleghi, invece, hanno prodotto un dispositivo costituito da 3 canali: quelli esterni (sorgente e *sink*) sono collegati tramite i microsolchi a quello centrale, che contiene il gradiente chimico ²⁰.

Hamza e colleghi hanno sviluppato un dispositivo con un canale principale che contiene cellule e stimolo chemiotattico, e canali a forma di U per generare il gradiente chimico, il quale si forma per semplice diffusione. La concentrazione è più alta sull'estremità dei canali a forma di U e diminuisce lungo i due bracci ²¹.

I dispositivi basati su microscanalature utilizzano sia il trasporto convettivo che quello diffusivo per stabilire un gradiente chimico nella camera cellulare senza che si impongano sollecitazioni di taglio dirette sulle cellule. La variazione di complessità dei gradienti è modulabile, se si va a modificare la geometria dei microsolchi. I gradienti lineari vengono prodotti quando la larghezza delle micro-scanalature alle estremità opposte è uguale, mentre i gradienti non lineari vengono prodotti quando la larghezza delle micro-scanalature non è uguale. È invece possibile ottenere gradienti complessi combinando diversi disegni di microscanalature all'interno della regione in cui si genera il gradiente.

I limiti principali di questi dispositivi sono la necessità di una fabbricazione di canali multi-profondità, abbastanza complicata, e l'altezza del canale richiesta per la generazione del gradiente. Inoltre, questo tipo di dispositivi si basa sulla corrispondenza precisa delle portate del campione e delle varie soluzioni. Pertanto, questi sistemi microfluidici sono molto sensibili ai disturbi meccanici ¹⁰.

1.2.1 Leggi di Fick

Essendo il nostro dispositivo senza flusso, il gradiente avanza per diffusione.

La diffusione di una sostanza è indotta dalla differenza di concentrazione di tale sostanza nell'ambiente. Se si riporta in un grafico la concentrazione (C) in funzione della posizione (p), si otterrà una curva rappresentante il profilo di concentrazione, dove la pendenza sarà data dal gradiente di concentrazione, il quale è dato da: $\frac{dC}{dp}$.

Considerando che la velocità di diffusione è data dal flusso (J):

$$J = \frac{1}{A} \frac{dM}{dt}$$

dove A è la sezione unitaria ed M è la quantità di massa che diffonde in direzione perpendicolare nell'unità di tempo, si ottiene la prima legge di Fick che descrive il flusso di diffusione stazionaria in una direzione dipendente da un coefficiente di diffusione (D) e dalla concentrazione della materia:

$$J = -D \frac{dC}{dt}$$

in cui il segno meno è giustificato dal fatto che il flusso va in verso opposto all'aumento della concentrazione, D è espresso in $\left[\frac{m^2}{s}\right]$ e dipende sia dal materiale che diffonde sia da quello che lo ospita ed aumenta con la temperatura, mentre C è espresso in $\left[\frac{kg}{m^3}\right]$.

Nel caso in cui invece si abbiano flusso e gradiente varianti nel tempo, la diffusione è descritta dalla seconda legge di Fick in quanto il profilo di concentrazione non è più lineare:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial p} \left(D \frac{\partial C}{\partial p} \right)$$

2 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è la prototipizzazione di un lab-on-chip per l'analisi della chemiotassi in leucociti umani, ovvero "chemotaxis-on-chip". Il dispositivo è stato fabbricato in collaborazione con il laboratorio del Dott. Alessandro Polini, CNR Nanotec (Lecce), con la tecnica della fotolitografia e litografia soffice. Il polimero utilizzato per produrre le repliche dei dispositivi è il polidimetilsilossano (PDMS), largamente utilizzato nella fabbricazione dei dispositivi microfluidici per le sue proprietà (discusse in seguito nella sezione "Materiali e Metodi"). Il lab-on-chip verrà impiegato per valutare la chemiotassi granulociti differenziati in vitro da progenitori ematopoietici midollari (BM-MNC) isolati da pazienti SDS. Verrà inoltre valutato l'effetto del trattamento farmacologico con Ataluren sulle capacità chemiotattiche dei leucociti SDS.

3 MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI GENERALI

- Wafer di silicio (Wafer CZ-Si) da 4 pollici, spessore = $500 \pm 50 \mu\text{m}$, (100), lucidato su un lato, tipo p (boro), 0,001-100 Ohm cm, (MicroChemicals, Ulm, Germania);
- Acetone, 2-propanolo (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germania);
- Acqua deionizzata;
- Fotesist SU-8 2005, SU-8 2075 e soluzione di sviluppo SU-8 (Microchemicals);
- Elastomero di silicone Sylgard 184TM, base e agente curante (Dow, Milano, Italia).

3.2 POLIDIMETILSILOSSANO

Il polidimetilsilossano (PDMS) è un elastomero appartenente ai composti polimerici di organosilicio, comunemente chiamati siliconi.

Gli elastomeri sono polimeri amorfi (ovvero con mancato ordine interno), con bassa temperatura di transizione vetrosa. Questo permette a tali materiali di essere facilmente lavorabili a temperatura ambiente. In particolare, i polisilossani come il PDMS, hanno eccellente biocompatibilità e stabilità chimica in ambiente biologico, caratteristiche chiave per poter essere utilizzati in applicazioni biomediche.

Le proprietà che rendono il PDMS un materiale ideale nella fabbricazione di chip sono le seguenti:

- Sforzo di taglio di 0.25 MPa e un modulo di Young di circa 0.5 MPa. Ciò gli permette di conformarsi ad una superficie e formare il sistema microfluidico. Il modulo di taglio è, infatti, il parametro che definisce la deformazione tangenziale subita da un materiale a seguito di uno sforzo anch'esso tangenziale; esso è definito come la tangente dell'angolo (angolo di taglio) che si forma in seguito allo scorrimento provocato da forze parallele applicate in direzioni opposte

(1), o come il rapporto tra sforzo e deformazione tangenziali (modulo elastico e coefficiente di Poisson)(2).

Il modulo di Young (Figura 3a), invece, è l'indice di rigidità: legato alle interazioni chimiche delle molecole del materiale, non può essere modificato in alcun modo. Fornisce informazioni sulla capacità di un materiale di recuperare il proprio stato originale senza subire deformazioni una volta che è stato rimosso il carico: più è basso, maggiore sarà questa capacità.

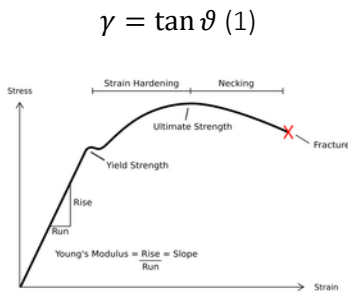


Figura 3a-Grafico sforzo deformazione. Sono illustrati i principali comportamenti dei materiali: elastico, plastico e fragile.



Figura 3b-Focalizzazione sulla porzione tensione-deformazione nel comportamento elastico lineare.

- Otticamente trasparente fino ad una lunghezza d'onda di 300nm, proprietà importante per le osservazioni in microscopia;
- Intrinsecamente idrofobico, caratteristica comune a tutti i siliconi, ma la sua superficie può essere resa idrofilica con un trattamento con ossigeno o con plasma.
- Permeabile ai gas e biocompatibile, caratteristiche che lo rendono idoneo al suo utilizzo nelle colture cellulari;
- Disponibile in commercio a prezzi accessibili.

3.3 PROGETTO DI LAVORO

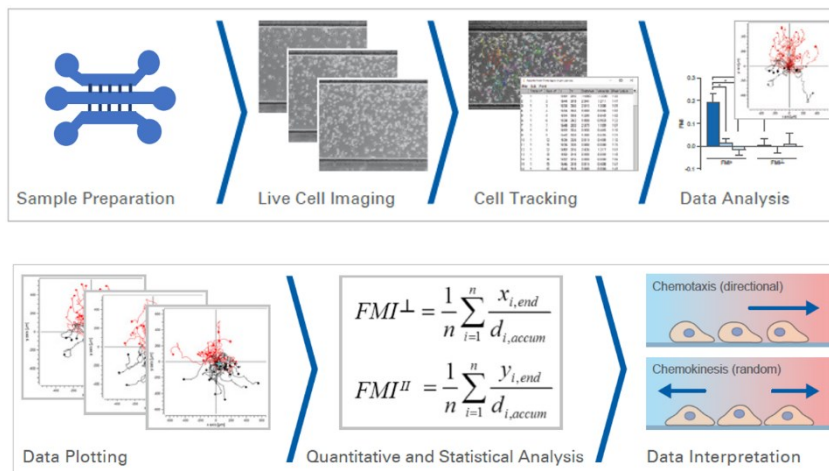


Figura 4-Descrizione del flusso di lavoro (immagine modificata da: Ibidi Application Guide: Chemotaxis Assays, www.ibidi.com).

3.4 PROCEDURA DI FABBRICAZIONE DEL CHIP

3.4.1 Litografia

Le tecniche litografiche sono usate per la riproduzione di specifici disegni/pattern che possono variare tra grandezze dell'ordine di $10^{-6} - 10^{-3}$ m (micro- e nanolitografia).

Esistono due principali tipologie di litografia, suddivise in base all'uso o meno di una maschera litografica (Figura 5).

In questa tesi verrà considerata solo la litografia con maschera, la quale consiste nell'utilizzo di uno stampo per trasferire il disegno sull'area interessata. Questa categoria include la fotolitografia, la litografia soffice e la fotolitografia *nanoimprint*.

La fotolitografia è la tecnologia più utilizzata nella microfabbricazione ed è la tecnica utilizzata, assieme alla litografia soffice, per fabbricare il chip utilizzato in questa tesi di Laurea.

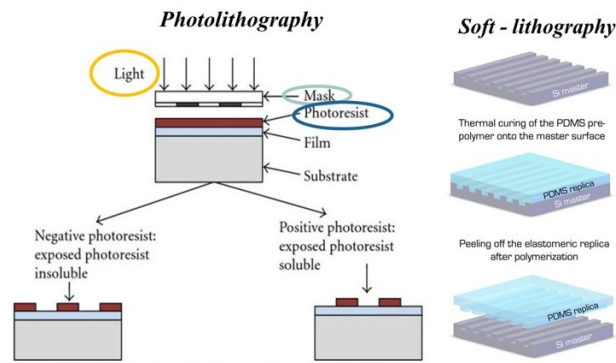


Figura 5-Fotolitografia e litofotografia soft a confronto.

3.4.1.1 Fotolitografia

La fotolitografia permette di trasferire, tramite luce UV, il pattern desiderato presente su una maschera, su un substrato di silicio e ricoperto da un polimero sensibile alla luce (fotoresist). Il fotoresist è un materiale fotosensibile capace di modificare, dopo l'esposizione ai raggi UV, la propria struttura chimica, cambiando la sua solubilità quando viene inserito nello sviluppatore (solvente in grado di degradare selettivamente il resist).

È possibile distinguere due diversi tipi di fotoresist:

- o Positivo: la luce UV provoca la rottura dei legami chimici, quindi il resist diventa più solubile nella soluzione di sviluppo e viene quindi rimosso il resist che è stato esposto a raggi UV.
- o Negativo: la luce UV provoca la polimerizzazione del resist che, indurendosi, non viene lavato via dalla soluzione di sviluppo. Il resist rimane sulla superficie del substrato dove è stato esposto a raggi UV, mentre la soluzione di sviluppo rimuove il resto.

In questo progetto per fabbricare i chip è stato utilizzato un fotoresist negativo (SU-8).

Nonostante questa tecnica sia ben ottimizzata, esistono diverse limitazioni da considerare:

- o la risoluzione della fotolitografia che dipende dal tipo di luce usato;
- o la varietà dei semiconduttori utilizzati per il substrato;
- o le superfici non perfettamente planari.

In riferimento al primo punto sopracitato, se si usa la luce UV, l'ordine di grandezza più piccolo raggiungibile è dei μm ; per superare questo problema si può diminuire la lunghezza d'onda del fascio di luce usato (ad esempio utilizzando un fascio elettronico o raggi X). In questo processo, la risoluzione (R) dipende dai limiti dettati dalla legge di Rayleigh per la diffrazione ottica:

$$R = \frac{k\lambda}{NA}$$

dove:

k =costante tipica del materiale;

NA = apertura numerica del sistema ottico usato per ridurre le dimensioni e riportare il pattern della maschera sul fotoresist.

Quindi, per migliorare la risoluzione e diminuire le dimensioni del disegno sono necessari: radiazioni ottiche con $\lambda < 10$ nm e un sistema ottico con NA ampio.

Primo livello

Durante il processo litografico con il primo livello (Figura 6) vengono fabbricati i microcanali, i quali, nel nostro caso, sono 61 solchi di $250 \mu m$ di lunghezza, $10 \mu m$ di larghezza e $5 \mu m$ di altezza, che collegano i 3 macrocanali, fabbricati nel secondo step del processo litografico.



Figura 6-Processo di formatura primo livello.

Il substrato, che in genere è un wafer di silicio (Si), viene lavato con solventi organici, acetone, e 2-propanolo, per eliminare eventuali contaminanti.

In seguito, si passa allo *spin-coating*, dove uno strato di resist SU-8 2005 viene depositato sul substrato e centrifugato a 2400 rpm, permettendo di ottenere uno strato uniforme di resist con un'altezza controllata. La velocità dello *spinner*, insieme alla viscosità del materiale, incide particolarmente sullo spessore che si desidera ottenere.

Lo *spinner* è un sistema composto da un supporto forato (mandrino) posto su un albero rotante, sul quale viene prodotto il vuoto, tramite una pompa rotativa, per fissare il substrato al supporto. Una volta fissato il supporto al mandrino, alcune gocce di fotoresist vengono depositate sulla fetta di Si e il supporto inizia a ruotare.

Successivamente il wafer viene sottoposto a *soft bake* a 95 ° C per 2 minuti, al fine di eliminare il solvente in eccesso dal film ottenuto.

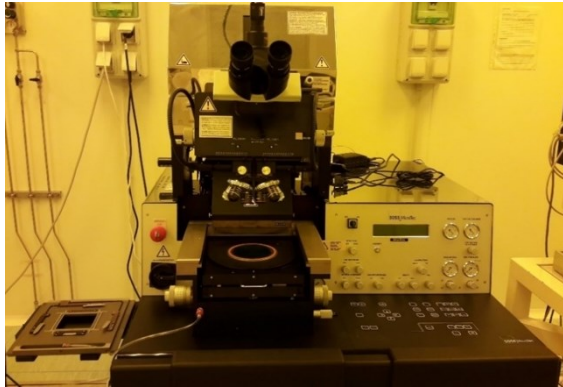


Figura 7a-Allineatore di maschera (MA/BA6, SUSS MicroTec).

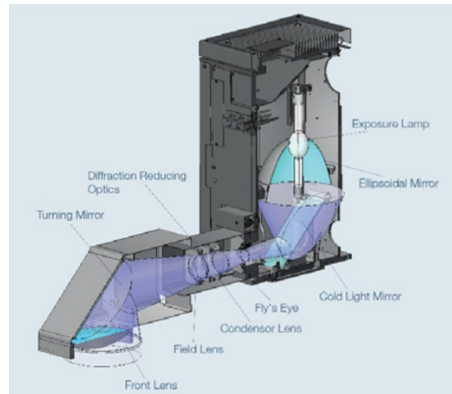


Figura 7b-Sistema ottico di SUSS MA/BA6 allineatore di maschera.

Segue una fase di esposizione. In tutti i processi fotolitografici, per la fabbricazione del master è stato utilizzato il MA/BA6 *mask aligner* della SUSS MicroTec (Figura 7a). Il provino è stato fissato su un tavolino mobile collegato a tre viti micrometriche che consentono il movimento sia traslatorio, nei due sensi del piano, sia rotatorio, in senso orario e antiorario. La mobilità del porta campioni, unita alla presenza di due ottiche microscopiche, consente la possibilità di eseguire litografie multilivello, poiché permette di allineare i vari *pattern* presenti sulla maschera con quelli presenti sul campione. Il movimento delle ottiche sull'asse xy per l'individuazione delle tracce e sull'asse z per focalizzarle, è controllato da una tastiera *trackball*. Per facilitare la procedura di allineamento, l'apparecchiatura (Figura 7a) esegue un controllo (compensazione dell'errore del cuneo) sul peso e sulla forma della maschera e del campione con l'obiettivo di posizionarli parallelamente tra loro, utilizzando piccoli movimenti del piano porta campione.

Dopo il *soft bake*, il wafer ricoperto di SU-8 2005 viene esposto per 30 secondi utilizzando luce UV con $\lambda=365\text{nm}$, che attraversa la maschera contenente il motivo a microsolchi dei microcanali del chip.

Successivamente, il wafer viene posto sulla piastra calda a 95 ° C per 3 minuti (*post bake*) e il fotoresist viene sviluppato, utilizzando una specifica soluzione di sviluppo. Infine, il wafer viene posto sulla piastra calda a 185 ° C per 25 minuti (*hard bake*).

Secondo livello

Con il secondo livello si formano i macrocanali che saranno collegati ai *reservoir* (di diametro 6mm) nei quali si potranno iniettare le cellule, il medium e gli stimoli necessari.

Nel caso preso in considerazione in questa tesi i macrocanali sono ampi 500 μm , si estendono per 6mm e sono in posizione perpendicolare ai microcanali.



Figura 8-Processo di formazione del secondo livello.

Alcune gocce di SU-8 2075 vengono depositate sul substrato di silicio, dove è già stato fabbricato il primo modello, alla velocità di rotazione di 1000 rpm per 60 secondi. Il wafer viene fatto essiccare (*soft bake*) a 65 °C per 10 minuti e poi a 95 °C per 40 minuti (è stata testata una durata diversa di queste fasi per ottenere una procedura ottimizzata, in base al *data sheet* dell'SU-2075). In seguito, il substrato viene allineato ai macrocanali, utilizzando specifici *marker* presenti sulla maschera oltre che sul wafer di silicio, ed esposto alla luce UV per 45". Quindi, il substrato esposto viene posto sulla piastra calda a 65 °C per 2 minuti e poi a 95° C per 7 minuti (*post bake*). In fase finale, il fotoresist viene sviluppato utilizzando una specifica soluzione di sviluppo e posto sulla piastra calda a 185 ° C per 25 minuti (*hard bake*) (Figura 8).

3.4.1.2 Litografia soffice

La litografia soffice include una serie di tecniche che hanno come peculiarità quella di replicare le caratteristiche del master (forma, morfologia, struttura), utilizzando un materiale elastomerico, come il PDMS. In questo progetto di tesi è stata usata la tecnica di litografia soffice del *Replica Molding* che utilizza il master in silicio come uno stampo per creare il *device* microfluidico (figura 9).

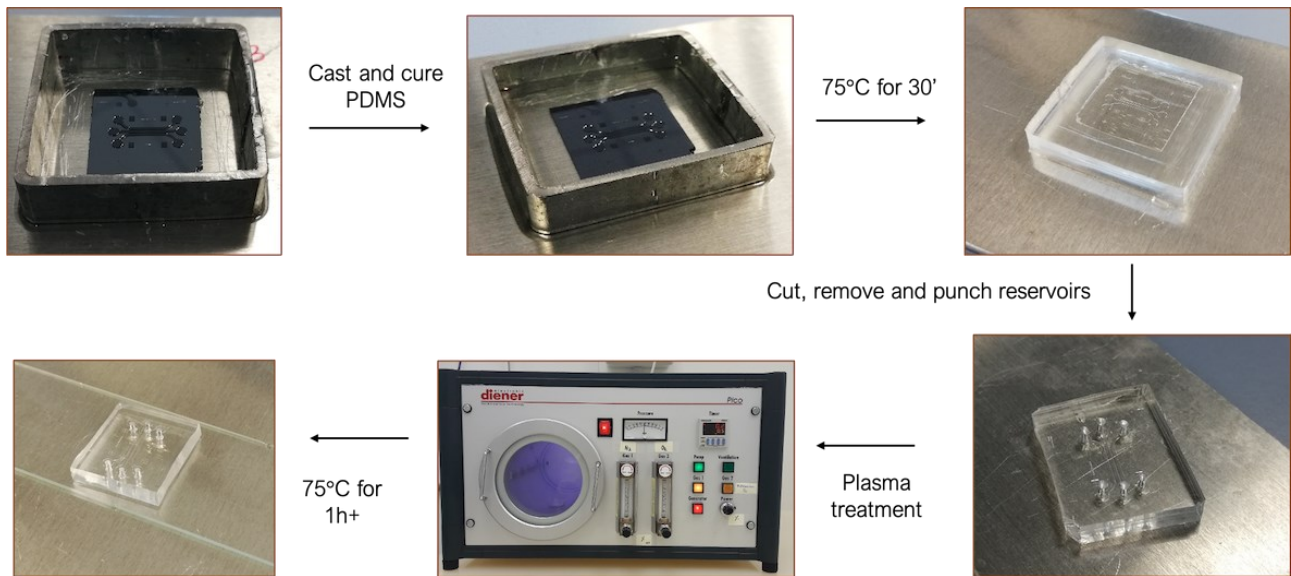


Figura9-Processo di litografia soffice.

Per produrre un dispositivo PDMS, il prepolimero e l'agente curante vengono miscelati in un contenitore usa e getta in proporzione 10:1.

Durante la progettazione del *device* è importante prestare particolare attenzione in quanto la gravità, l'adesione e le forze capillari sono fonte di stress per la struttura, la quale potrebbe collassare provocando un'alterazione del modello. Se il modello è troppo alto le microstrutture PDMS cadono sotto il loro stesso peso; al contrario, se l'*aspect ratio* è troppo basso, le strutture non possono resistere alle forze di compressione tipiche della stampa e all'adesione tra timbro e supporto. I rapporti tra le caratteristiche l/h devono essere compresi tra circa 0,2 e 2 per ottenere un dispositivo privo di difetti.

3.4.2 Trattamento al plasma e *thermal bonding*

Il plasma, quarto stato della materia, è un gas ionizzato che diventa altamente conduttivo elettricamente, ottenuto incrementando l'energia delle molecole dopo lo stato gassoso; è caratterizzato da particelle cariche, ioni positivi ed elettroni, globalmente neutri. Nonostante sia globalmente neutro, al suo interno si possono creare piccole divergenze di concentrazione delle particelle cariche. Quando in un plasma in equilibrio si verificano fluttuazioni di carica: $\delta q = e(\delta n_i - \delta n_e)$, le densità locali di particelle positive $n_i(x)$ e negative $n_e(x)$ sono leggermente diverse lungo la lunghezza di perturbazione $\delta(x)$ e questo genera un intenso campo elettrico che tende ad espellere la carica in eccesso nel punto in cui si è generata, cioè tende a ripristinare la neutralità locale. Questo tipo di fluttuazioni avviene lungo la distanza caratteristica λ_{Dz} .

La distanza entro la quale le cariche mobili sono in grado di schermare il campo elettrico in un plasma è detta lunghezza di Debye:

$$\lambda_{D_z} = \sqrt{\frac{K_B T_z}{4\pi n_z e_z^2}}$$

dove $K_B T_z$ rappresentano la temperatura, e_z è la carica della specie considerata cioè $e_i = Ze$ per gli ioni e $e_e = -e$ per gli elettroni.

Considerando una fluttuazione molto piccola del potenziale sferico $\delta\Phi(r)$ generata dalla densità di carica $\delta\rho_{\text{ext}} = q\delta(r)$ (dove $\delta(r)$ è la funzione delta di Dirac); l'equilibrio allora risulta perturbato e si genera una distribuzione spaziale di carica $\rho_{\text{sp}} = e(\delta n_i(r) - \delta n_e(r))$. Abbiamo quindi una densità di carica totale perturbata:

$$\delta\rho = \delta\rho_{\text{ext}} + \delta\rho_{\text{sp}} = q\delta(r) + e(\delta n_i(r) - \delta n_e(r))$$

Assumendo che la fluttuazione locale del potenziale indotta da q sia piccola, cioè considerando il rapporto tra energia elettrostatica ed energia termica:

$$\left| \frac{e\delta\Phi(r)}{K_B T_z} \right| \ll 1$$

con $\phi(r)$ potenziale elettrostatico,

e considerando l'equazione al primo ordine riferita alla concentrazione di particelle cariche:

$$n_z = n_0 \left(1 \pm \frac{e_z \delta\Phi(r)}{K_B T_z} \right) \quad \text{con} \quad \frac{e_z \delta\Phi(r)}{K_B T_z} = \delta n_z(r)$$

dove n_0 è una costante,

possiamo sostituire nell'equazione di Poisson:

$$\nabla^2 \delta\Phi(r) = -4\pi\delta\rho = -4\pi \left(q\delta(r) + \frac{e^2 n_0}{K_B T_i} \delta\Phi(r) + \frac{e^2 n_0}{K_B T_e} \delta\Phi(r) \right)$$

che può essere scritta in forma ridotta come:

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{\lambda_D^2} \right) \delta\phi(r) = -4\pi q \delta(r) \quad \text{con} \quad \frac{1}{\lambda_D^2} = \frac{1}{\lambda_{D_i}^2} + \frac{1}{\lambda_{D_e}^2}$$

La soluzione dell'equazione per il potenziale $\delta\Phi(r)$ considerando la carica perturbante q puntiforme è per $r > 0$

$$\delta\phi(r) = \frac{q}{r} \exp\left(-\frac{r}{\lambda_D}\right)$$

L'ampiezza delle fluttuazioni del potenziale decade esponenzialmente con andamento $1/\lambda_D$, ciò significa che all'esterno la perturbazione locale di carica q risulta schermata da una nuvola di cariche opposte con raggio proporzionale alla lunghezza di Debye. Il maggiore contributo allo schermaggio deriva dagli elettroni perché in generale $k_B T_e > k_B T_i$.

Il trattamento al plasma è utilizzato con lo scopo di modificare le qualità superficiali di un materiale e, in conseguenza, implementare la sua capacità di adesione.

Questo processo può essere fatto in una camera o in un ambiente isolato a basse temperature, ciò permette di trattare anche i materiali altamente sensibili. L'aria è pompata fuori e un gas può fluire a bassa pressione prima che venga applicata l'energia in forma di potenza elettrica. Layer in PDMS microstrutturati possono essere sigillati irreversibilmente allo stesso PDMS (a sua volta microstrutturato o *flat*), oppure a vetro, silicio, polistirene, polietilene o nitrato di silicio, esponendo sia la superficie del PDMS che la superficie del substrato ad aria o ossigeno-plasma. Un trattamento al plasma con ossigeno produce gruppi silanolo sul PDMS e gruppi funzionali -OH sugli altri materiali; di conseguenza, quando le superfici vengono portate a contatto, si stabiliscono legami covalenti -O-Si-O tra i gruppi polari e il PDMS ossidato. In questa tesi di Laurea è stato usato il Diener electronic PICO *low-pressure plasma system* (Figura 10). Finito il processo, il dispositivo PDMS è stato posizionato sul vetrino da microscopia con la superficie contenente i canali a contatto con il vetro.

Per l'adesione del PDMS al vetro è stato effettuato il procedimento di *thermal bonding* nel quale i substrati vengono riscaldati a una temperatura prossima o superiore a T_g (transizione vetrosa), applicando una pressione per aumentare le forze di contatto di accoppiamento. La combinazione di temperatura e pressione può generare un flusso di polimero sufficiente all'interfaccia per ottenere un contatto totale, con interdiffusione di catene polimeriche tra le superfici che portano a un forte legame. L'incollaggio termico può essere ottenuto tra due materiali identici o dissimili. Questo è un procedimento di estrema delicatezza in quanto c'è il rischio di distorsione/deformazione del canale e/o collasso del canale stesso nonché della piastra di copertura a causa di temperatura, scelta dei materiali e pressione non ottimizzate.

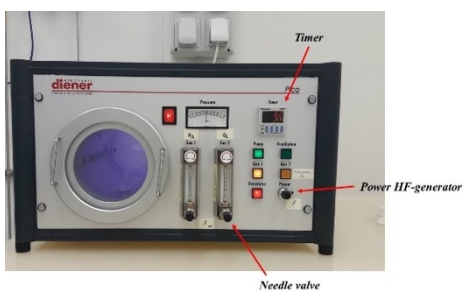


Figura 10-Pico low-pressure plasma system.

3.4.3 DISPOSITIVI UTILIZZATI

3.4.3.1 *Microscopio ottico*

Il microscopio ottico è utile nell'intero processo fotolitografico perché permette di controllare tutti i passaggi.

La maggior parte dei microscopi presenta gli stessi componenti: l'oculare, la torretta e le lenti dell'obiettivo, le manopole di messa a fuoco, il tavolino portaoggetti dove è posizionato il campione, la sorgente di luce, il diaframma, il condensatore e il tavolino meccanico. I microscopi utilizzati in questo lavoro di tesi sono stati principalmente due: un microscopio ottico invertito Olympus CK2 (in un microscopio verticale la sorgente luminosa e il condensatore si trovano sotto il tavolino, rivolti verso l'alto e gli obiettivi si trovano nella parte superiore, rivolti verso il basso; nei microscopi invertiti, gli obiettivi sono situati in basso e la sorgente luminosa nella parte superiore) (Figura 11) e un microscopio Nikon Eclipse 80i equipaggiato con una fotocamera Nikon DSVi1.

Il primo è stato usato per il controllo dell'equilibratura del chip e per la conta finale delle cellule migrate nel secondo canale del dispositivo una volta finita l'acquisizione; il secondo per acquisire le immagini del saggio di chemiotassi su chip in *real-time*. Per entrambi i microscopi è stato usato un obiettivo con ingrandimento 10X.

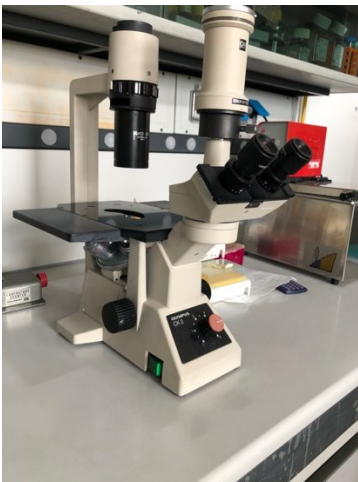


Figura 11-Microscopio Olympus CK2 usato in questa tesi.

3.4.3.2 *Profilometro*

Un profilometro è un dispositivo utilizzato per misurare e quantificare le proprietà della superficie, ad esempio l'altezza del gradino, la rugosità e la geometria.

In ogni profilometro sono presenti due parti principali:

- un rivelatore per localizzare la posizione dei punti sul campione;
- una fase di campionamento in cui viene posizionato il campione.

Esistono due tipi di profilometro e tre di funzionamento.

Per quanto riguarda il funzionamento la prima possibilità è che si sposti il rilevatore, la seconda è che il tavolino di campionamento si sposti per consentire la misurazione, mentre in altri casi si muovono entrambi. Per le tipologie di dispositivo si ha: 1) profilometro ottico, o senza contatto e stilo, che usa la luce; 2) profilometro a contatto (Figura 12a-12b), che fruisce di una sonda fisica. Nella seconda tipologia di profilometro, uno stilo diamantato viene spostato lungo l'asse Z ed entra in contatto con il campione. La posizione in altezza dello stilo produce un segnale che viene visualizzato dopo che è stato convertito in digitale. Questo metodo è più lento di quello ottico perché richiede movimenti fisici su tutti e tre gli assi X, Y e Z. Per questo progetto è stato usato un profilometro a contatto KLA Tencor P-15.

Per scansionare la superficie, si crea un programma di scansione in cui vengono impostati tutti i parametri, quali: velocità, frequenza di campionamento e lunghezza.

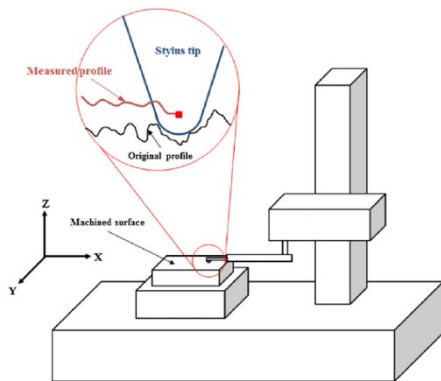


Figura 12a-Schema di un profilometro a contatto.



Figura 12b-Profilometro a contatto KLA Tencor P-15.

3.5 LAB-ON-CHIP

In questo paragrafo si andrà a descrivere il protocollo per la preparazione del chip e il suo utilizzo per la valutazione della chemiotassi nelle cellule di interesse per questo progetto. Verrà anche fatto riferimento ai protocolli di isolamento delle cellule derivate da paziente inserite nel dispositivo e alla preparazione dello stimolo chemiotattico.

3.5.1 Equilibratura

Dopo la fase di produzione del chip la sua qualità, ovvero il controllo del buon funzionamento della microfluidica del sistema, è stata valutata utilizzando acqua ultrapura. Questa procedura è avvenuta in due step:

- 1) è stato inserito del liquido da un reservoir per accertarsi del raggiungimento del liquido nel reservoir opposto e il riempimento dei canali senza perdite (ripetuto per tutti i reservoir di uno stesso lato);

- 2) sono stati inseriti volumi decrescenti di terreno di coltura per cellule eucariotiche a livello dei tre macrocanali per creare un flusso e favorire il riempimento dei microcanali.

I chip successivamente sono stati svuotati e sterilizzati ai raggi UV per un'ora.

L'equilibratura è stata ripetuta il giorno prima dell'utilizzo del chip, aggiungendo 120 μ L di terreno di coltura per lo step 1) sopracitato la cui composizione può variare in base al tipo di cellule usate (Figura 13). I chip vengono lasciati ad equilibrare *overnight* in incubatore a 37°C, 5% CO₂. Se la microfluidica del sistema è priva di difetti, il giorno seguente tutti i microcanali saranno pieni di liquido, non saranno presenti bolle di aria che ostruiscono i canali e il chip può essere utilizzato per le attività sperimentali.

In questa tesi i terreni cellulari impiegati sono stati l'Iscove Modified Dulbecco Medium (IMDM), per la coltura di cellule mononucleate staminali derivanti da midollo osseo (BM-MNC), e l'RPMI 1640 per le colture primarie di granulociti neutrofili e di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC).

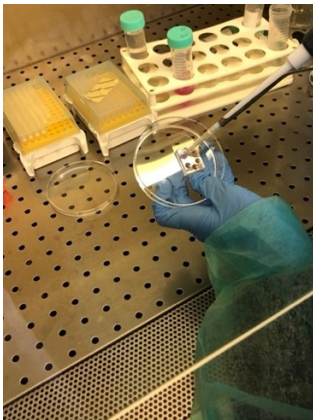


Figura 13-Fase di inserimento del medium per l'equilibratura.

3.5.2 Utilizzo di campioni biologici umani

I progenitori ematopoietici midollari e i neutrofili primari sono stati ottenuti da un paziente maschio di 9 anni, affetto da SDS (genotipo c.258+2T>C/c.183-184TA>CT) che presentava: malformazioni ossee, neutropenia grave (conta neutrofilica 680 cell/mm³), insufficienza pancreatica e ritardo psicomotorio. I campioni ematici e midollari che sono stati analizzati in questa tesi sono stati prelevati e utilizzati solo dopo che il consenso informato è stato firmato, secondo le normative vigenti e in accordo con la dichiarazione di Helsinki.

I metodi sono stati eseguiti secondo le linee guida approvate dal comitato etico dell'azienda ospedaliera universitaria Ospedali Riuniti di Ancona (approvazione CERM 2018-82).

3.5.3 Preparazione delle cellule e dello stimolo

Sono stati isolati neutrofili, PBMC e BM-MNC da biopsie midollari e da prelievi venosi di pazienti affetti da SDS. Per l'isolamento dei PMN è stata eseguita una centrifugazione a gradiente di Percoll (Sigma Aldrich), come descritto in letteratura. Durante la centrifugazione a gradiente, il campione si distribuisce a varie altezze in base alla densità, facendo sì che le cellule si separino in base alla loro morfologia e alle dimensioni. Come risultato si avranno diversi livelli di separazione, che permetteranno la distinzione dei vari tipi di cellule: i neutrofili si troveranno all'interfaccia tra il sedimento di globuli rossi ed il Percoll. Proprio per la posizione in cui si trovano, molto prossima agli eritrociti, sarà necessaria una successiva lisi di questi ultimi, in modo da ottenere una popolazione cellulare leucocitaria omogenea.

Sia i PBMC che i BM-MNC sono stati invece isolati tramite centrifugazione di un gradiente di Ficoll Paque Plus (Sigma Aldrich) secondo il protocollo fornito dal produttore. Entrambe le popolazioni si troveranno nell'anello presente all'interfase tra il buffer salino ed il Ficoll.

Inoltre, le cellule ottenute da pazienti con SDS sono state trattate con Ataluren, la cui efficacia nel correggere le mutazioni nonsense presenti in uno dei due alleli dei pazienti (mutazione c.183-184TA>CT) è già stata riportata nel 2017¹⁶. I chip sono stati utilizzati quindi per testare l'eventuale correzione della direzionalità chemiotattica dei neutrofili SDS, che è stato riportato essere alterata. L'ipotesi è che Ataluren, correggendo il difetto di base della SDS, possa migliorare la differenziazione dei progenitori in neutrofili maturi e correggere la mancata direzionalità chemiotattica. Per questo motivo le cellule staminali sono state messe in coltura in 3 diverse condizioni: DMSO (usato come veicolo del farmaco), Ataluren 2.5µM, Ataluren 5µM. Ogni condizione è stata analizzata dopo 24h di incubazione (il run con DMSO è stato fatto con e senza stimolo).

La stimolazione della chemiotassi è stata indotta con una soluzione di N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) (1µM), e Interleuchina (IL)-8 (100ng/ml). Questi due stimoli sono stati ampiamente descritti in letteratura come potenti chemiotattici per granulociti neutrofili. Lo stimolo è stato iniettato nel macrocanale superiore al fine di generare un gradiente di concentrazione dello stimolo e poter osservare la migrazione leucocitaria indotta dal gradiente stesso.

3.5.4 Preparazione del chip per il run

Per prima cosa è stato necessario controllare al microscopio l'effettiva equilibratura del chip. Se tutti i macrocanali ed i microcanali sono privi di aria è possibile procedere. Sarà necessario distinguere due fasi: svuotamento e riempimento del chip. Rimane di estrema importanza non creare bolle d'aria. Per l'inoculo delle cellule nel chip, si procede come per la fase di equilibratura, avendo l'accortezza di non inclinare il chip in quanto si potrebbe creare una fluttuazione del volume di terreno contenente le cellule che comprometterebbe l'esperimento, basato proprio sullo studio del movimento degli eventi cellulari considerati.

Nei chip riportati in questa tesi è stata iniettata una quantità di 30µl di sospensione cellulare alla densità di 5×10^5 cellule/ml, inserite nel primo macrocanale posto in basso rispetto all'operatore. Per quanto riguarda i neutrofili primari, sono stati utilizzati subito dopo il loro isolamento da sangue periferico, mentre le BM-MNC sono state seminate dopo una prima incubazione di 24h a 37°C, 5%CO₂ e 95% umidità, in terreno liquido IMDM addizionato con 10% *fetal bovine serum* (FBS) (Sigma Aldrich), 1% glutammina (Sigma Aldrich), 20ng/ml *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) (Filgrastim, Hospira UK Limited, Hurley, Regno Unito) al fine di indurre la differenziazione in granulociti neutrofili (PMN). La chemiotassi su chip è stata valutata nelle BM-MNC differenziate in PMN dopo 24h, confrontando il controllo in assenza di farmaco (DMSO) con il trattamento con Ataluren a due concentrazioni diverse (2,5 e 5 µM). Nel macrocanale centrale sono stati iniettati 30 µl di *medium* (IMDM per le BM-MNC e RPMI 1640 per i neutrofili). Nel canale superiore si è inserito lo stimolo di chemiotassi (fMLP e IL-8, 30µl) immediatamente prima dell'inizio del *run*, o in alternativa 30 µl di solo *medium* nel caso del controllo negativo di chemiotassi.

3.5.5 Acquisizione del run

Sono state effettuate 14 acquisizioni totali.

Ognuna delle condizioni descritte nel paragrafo 3.5.3 è stata analizzata dopo 24h per il paziente SDS50 (il run con DMSO è stato fatto con e senza stimolo), per il controllo sano sono invece stati fatti solo due run, uno con e l'altro senza stimolo. Le immagini del run sono state acquisite avvalendosi di un microscopio Nikon Eclipse 80i equipaggiato con una fotocamera Nikon DSVi1. Le immagini sono state elaborate digitalmente tramite software Nis Elements D, impostato per l'acquisizione automatica in *time-lapse* di 60 *frames* in 60 minuti. Essendo un chip ideato per lo studio di chemiotassi in statica, esso si basa sulla diffusione del gradiente di concentrazione. Una precedente valutazione del gradiente chimico è stata eseguita nella fase di settaggio del dispositivo, condotta presso il CNR Nanotec di Lecce. Questo studio preliminare ha permesso di considerare un'ora come una finestra temporale sufficiente per osservare il movimento cellulare verso il gradiente, che tende ad esaurirsi nel tempo. Lo stimolo è stato iniettato direttamente sulla postazione di acquisizione immagini per rendere il tempo zero di acquisizione il più vicino possibile al tempo zero ideale. Le immagini acquisite durante le fasi sperimentali sono state salvate in formato *.avi per la successiva analisi di immagine. Alla fine del run, i macrocanali del chip sono stati osservati al microscopio ottico per la conta delle cellule migrate nel secondo canale in seguito alla chemiotassi.

3.5.6 Analisi dei dati

L'analisi delle immagini è stata eseguita con il programma freeware Fiji (ImageJ software versione 1.53c, NIH, Bethesda, USA).

Il *tracking* delle cellule è stato eseguito in modalità manuale, utilizzando il plug-in "Manual Tracking", che permette di seguire le cellule singolarmente e visualizzare, come risultato, un video con evidenziato, in colori

diversi, il percorso di ogni evento cellulare scelto. Successivamente è stato utilizzato il plug-in “Chemotaxis and Migration Tools” per analizzare i dati.

Una volta aperto il video tramite Fiji, per eseguire il tracking manuale, il processo è stato eseguito nel seguente modo:

1. è stato fatto un duplicato del filmato;
2. è stata raddrizzata l’immagine a causa della precedente difficoltà di allineare perfettamente il microscopio con il gradiente;
3. è stata settata la scala d’immagine inserendo i parametri della distanza in pixels per μm , la misura del pixel e altri parametri che dipendono dalla risoluzione dell’immagine e dalla CDD camera del microscopio utilizzato;
4. sono stati settati i parametri del plug-in “Manual tracking inserendo principalmente il tempo d’intervallo tra un frame di acquisizione e l’altro e la dimensione del singolo pixel;
5. è stato selezionato “Add track”, scelto un evento cellulare da seguire e iniziato il tracciamento cliccando di frame in frame il centro della cellula. Nel contempo è uscita una tabella in cui venivano mostrati i parametri della posizione dell’evento scelto in ogni frame. Infine, selezionando l’opzione “Dots & Line” è stato possibile visualizzare tutto il percorso, cioè la traiettoria, della cellula scelta. Una volta finito il procedimento è stato ripetuto per tutti gli eventi necessari per poter fare l’analisi dati e poter concludere se l’evento di migrazione cellulare osservato fosse randomico o direzionato verso lo stimolo chemiotattico.

Al fine dell’analisi sono stati valutati: indice di chemiotassi (Forward Migration Index o FMI), linearità, centro di massa, test di Rayleigh, distanza accumulata, distanza media euclidea e velocità di chemiotassi. In questa tesi verranno riportati il FMI, il test di Rayleigh e la velocità di migrazione. Il primo rappresenta l’efficienza della migrazione cellulare e come gli eventi cellulari si correlano alla direzione di entrambi gli assi cartesiani. Il FMI è descritto dalla seguente formula, dove per $x_{i,end}$ e $y_{i,end}$ si intende la posizione finale delle cellule rispettivamente sull’asse delle x o y e per $d_{i,accum}$ la distanza accumulata:

$$FMI^{\perp} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{x_{i,end}}{d_{i,accum}}$$

$$FMI^{||} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{y_{i,end}}{d_{i,accum}}$$

Il secondo, è un test statistico che serve a valutare l’uniformità della distribuzione dei punti. Come ogni test statistico, il suo valore dipende fortemente dal numero di cellule che vengono analizzate. In questa

fase di prototipizzazione si è deciso di tenere come numero minimo di eventi cellulari analizzabili 20 cellule.

La velocità di migrazione invece è un indice di chemochinesi. Con questa analisi si va a stabilire se anche la velocità di movimento degli eventi cellulari durante l'esperimento di chemiotassi è influenzata dal difetto di base della SDS.

4 RISULTATI

4.1 FOTOLITOGRAFIA I E II LIVELLO

Il primo livello (Figura 14) è stato ottenuto con la procedura descritta nel paragrafo 3.4.1.1.

Usando il resist SU8-2005, è stata misurata l'altezza ottenuta del primo livello al profilometro, per verificare che fosse pari a $5\ \mu\text{m}$. Durante tutti gli step, un microscopio ottico è stato usato per verificare l'assenza di contaminazioni nel resist e assenza di difetti nel disegno.

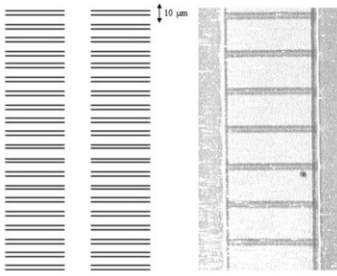


Figura 14- Illustrazione schematica del disegno ottenuto con la fabbricazione di primo livello Fotolitografia II livello.

Il secondo livello (Figura 15) è stato ottenuto con la procedura descritta nel paragrafo 3.4.1.1.

Usando il resist SU8-2075, sono state ottenute altezze nel range dei $260 \pm 10\ \mu\text{m}$.

Durante tutti gli step, un microscopio ottico è stato usato per verificare l'assenza di contaminazioni nel resist e assenza di difetti nel disegno, mentre il profilometro è stato utilizzato per verificare l'altezza della struttura.

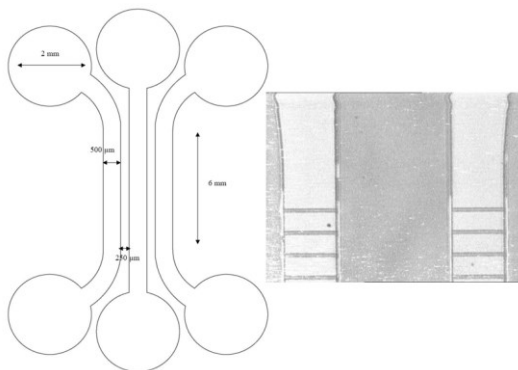


Figura 15 -Illustrazione schematica del disegno ottenuto con la fabbricazione del secondo livello.

4.2 LITOGRAFIA SOFFICE

La litografia soffice è stata eseguita come descritto nel paragrafo 3.4.1.2.

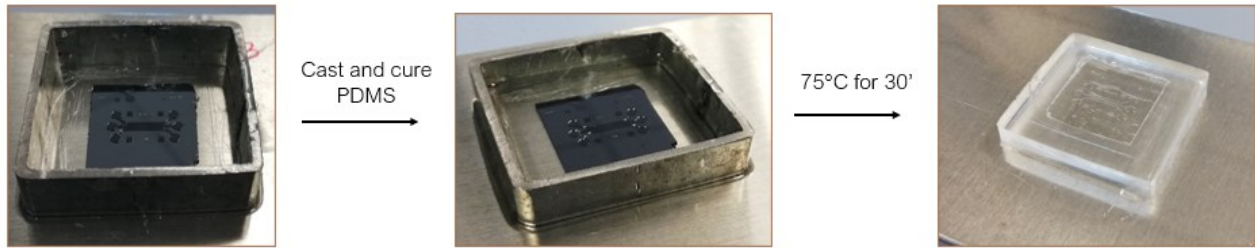


Figura 16-Immagine schematica della procedura di litografia soffice.

Il polimero di PDMS viene miscelato in rapporto 10:1 con l'agente curante e poi degassato utilizzando un essiccatore sottovuoto. Dopo 30 minuti, il PDMS è versato lentamente sullo stampo e messo in una stufa a 75 ° C per 30 minuti (Figura 16). Successivamente, utilizzando un *cutter*, il PDMS polimerizzato viene ritagliato e separato dallo stampo. Per perforare i reservoir, si posiziona la replica di PDMS, con il lato dei canali rivolto verso l'alto, e si utilizza un punzone affilato in acciaio inossidabile (Figura 17).

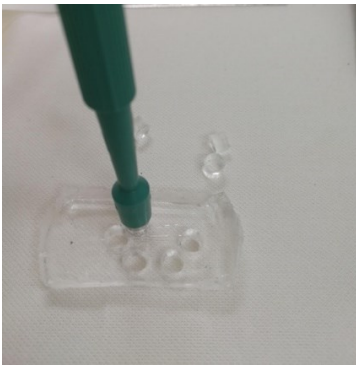


Figura 17-Ritaglio dei reservoir, in collaborazione con Dott.sa Nora Selicato, CNR Nanotec, Lecce.

4.3 TRATTAMENTO AL PLASMA

Prima del trattamento al plasma sia il PDMS che il vetrino da microscopio sono lavati con etanolo, dopo di che entrambi vengono inseriti nella camera del Diener electronic PICO *low-pressure plasma system* (Figura 12) e viene indotto il vuoto. La pressione è stata impostata al 50% utilizzando la valvola relativa all'ingresso dell'ossigeno, mentre la potenza al 50% W utilizzando il generatore Power HF. Il tempo di esposizione è stato ottimizzato a 10 secondi. Con questi parametri si ottiene un contatto conforme ottimale. Per rendere il legame tra vetrino e PDMS irreversibile è stato eseguito un trattamento con calore, inserendo i dispositivi in stufa a 75°C per 2 ore.

4.4 SET UP DEL DEVICE

Sono stati eseguiti diversi set-up per poter ottimizzare il saggio di chemiotassi del chip

A. Studio del gradiente

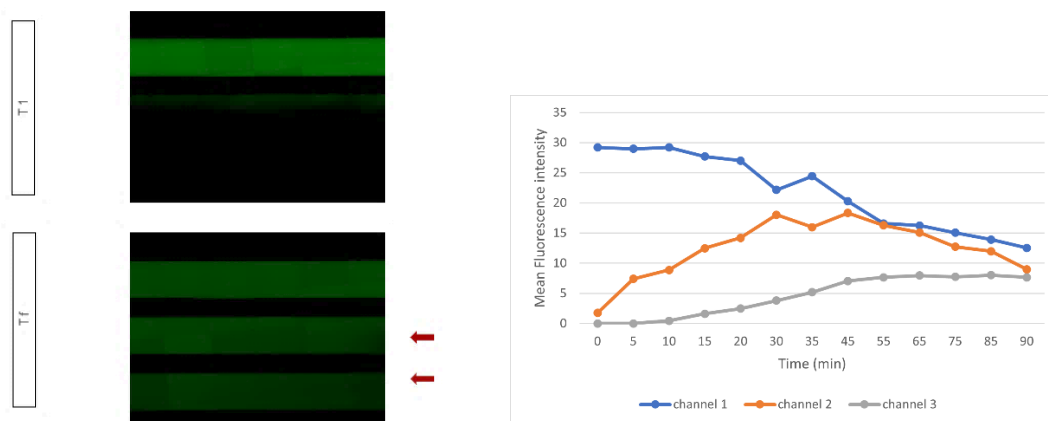


Figura 18-Il gradiente chimico è stato caratterizzato usando microscopia a fluorescenza. Per la sua valutazione è stato impiegato del Destrano marcato con FITC della dimensione di 10 kDa, simile alla dimensione dell'Interleuchina-8, il cui peso molecolare è di 8.4 kDa (in collaborazione con Dott.sa Nora Selicato, CNR Nanotec, Lecce).

Dell'acqua ultrapura è stata caricata nei tre reservoir, e in alto è stato aggiunto il composto fluoresceina isotiocianato (FITC)-Destrano per raggiungere una concentrazione finale pari a 100 nM (concentrazione impiegata per IL-8 negli esperimenti di chemiotassi). Il profilo di gradiente è stato monitorato in microscopia *time-lapse* usando un Microscopio Evos M7000 (Thermo Fisher Scientific, Monza), a temperatura ambiente. Le immagini sono state acquisite ogni 5 minuti per un massimo di 2 ore. L'intensità di fluorescenza è stata analizzata utilizzando ImageJ. Per ogni *frame*, il profilo d'intensità di fluorescenza è stato misurato, sottraendo il segnale di *background* e normalizzando sull'intensità massima di fluorescenza del frame analizzato (Figura 18). La valutazione del profilo di gradiente ha permesso di calcolare il range di tempo utile per svolgere gli esperimenti di migrazione cellulare, in cui l'equilibrio di concentrazione tra i tre canali non è stato ancora raggiunto.

B. Grandezza dei microcanali e densità cellulare di semina

Per valutare se la geometria dei microcanali fosse idonea al passaggio di una singola cellula per microcanale durante gli esperimenti di migrazione, sono stati utilizzati sia neutrofili primari che la linea cellulare THP1 (monociti umani immortalizzati) (Figura 19). La densità di semina è stata ottimizzata con la linea cellulare THP1 in modo da poter acquisire abbastanza eventi cellulari per poter eseguire il *tracking* con il software ImageJ.

La dimensione dei microcanali pari a 10 x 5 μm , consentiva il corretto passaggio dei leucociti attraverso i microcanali.

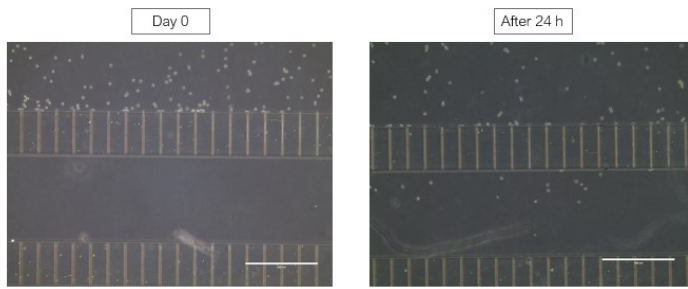


Figura 19 – Set up del prototipo chemotaxis-on-chip utilizzando cellule THP-1 (in collaborazione con Dott.sa Nora Selicato, CNR Nanotec, Lecce).

4.5 CHEMOTAXIS ON CHIP

Le cellule BM-MNC sono state differenziate stimolando con G-CSF (20 ng/ml), in presenza o in assenza di trattamento farmacologico con Ataluren, per 24 ore. I chip sono stati equilibrati come descritto nel paragrafo 3.5.1, le cellule impiegate e gli stimoli utilizzati sono stati preparati come descritto nel paragrafo 3.5.3. Il saggio di chemiotassi su chip è stato svolto come descritto nel paragrafo 3.5.4 e 3.5.5 e i risultati analizzati come descritto nel paragrafo 3.5.6.

Vengono riportati di seguito (Figura 20) i grafici ottenuti dal *tracking* manuale delle traiettorie delle singole cellule per la condizione di Controllo con DMSO in presenza di stimoli chemiotattici e il trattamento con Ataluren 2.5 μ M e 5 μ M in presenza di stimoli chemiotattici.

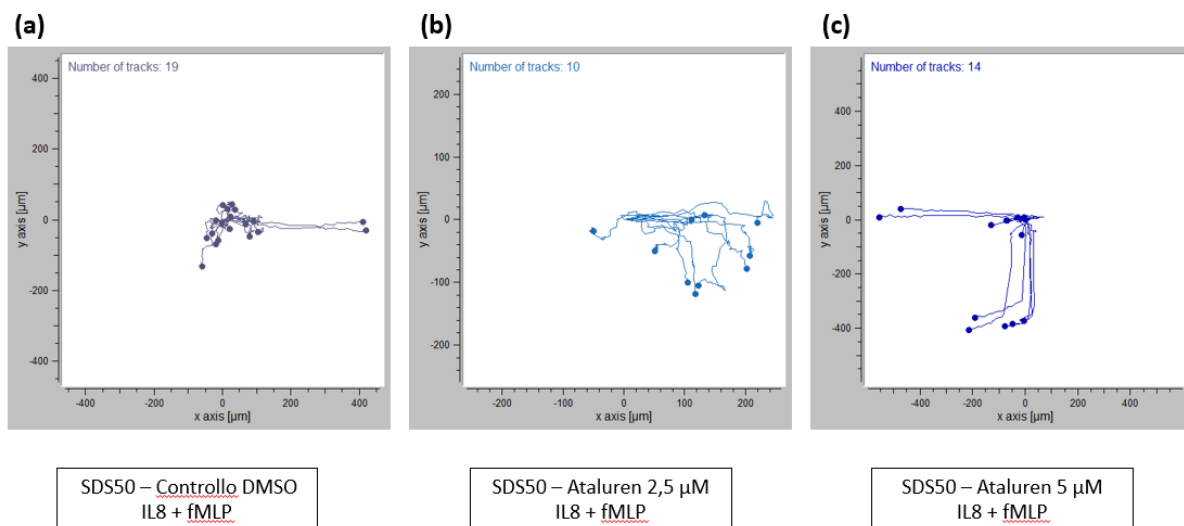


Figura 20 - Data Plot dei run di chemiotassi svolti per il paziente SDS50: (a) Data Plot del tracking manuale della condizione di controllo in presenza di stimoli chemiotattici; (b) Data Plot del tracking manuale del trattamento con Ataluren 2.5 μ M in presenza di stimoli chemiotattici; (c) Data Plot del tracking manuale del trattamento con Ataluren 5 μ M in presenza di stimoli chemiotattici.

Da questa prima prova, utile in qualità di *proof of concept*, osservando il grafico delle traiettorie è possibile notare come il gruppo trattato con Ataluren 2.5 e 5 μ M mostri una migrazione cellulare in direzione del gradiente chemiotattico. Al contrario, il controllo mostra una migrazione cellulare senza una chiara direzione.

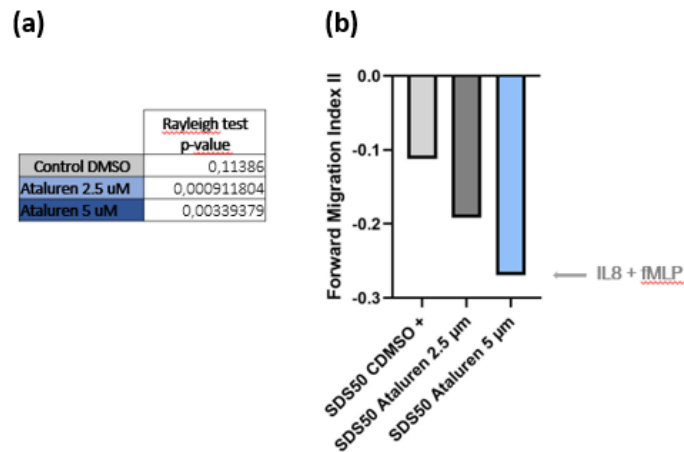


Figura 21. Indice di chemiotassi. (a) Valori del test di Rayleigh; (b) Istogramma con i valori degli indici di chemiotassi calcolati per il controllo e trattamento con Ataluren.

L'indice di chemiotassi parallelo al gradiente di concentrazione (Forward Migration Index II o FMI II) del gruppo trattato con Ataluren è più alto del FMI II del controllo in risposta agli stimoli chemiotattici (IL-8 e fMLP), ma in segno negativo in quanto è in verso opposto all'aumento di concentrazione (Figura 21).

Il *p*-value del test di Rayleigh è < 0.05 nel gruppo trattato con Ataluren e > 0.05 nel controllo. Prendendo tutti questi criteri in considerazione, l'analisi dei dati di questo esperimento suggerisce una migrazione del gruppo trattato con Ataluren non randomica e direzionale al gradiente di concentrazione degli stimoli chemiotattici.

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I lab-on chip per chemiotassi sono già stati sviluppati in precedenza ed alcuni sono già disponibili in commercio. Ad esempio, la Elveflow (www.elveflow.com), ha sviluppato un “microfluidic chemotaxis assay pilot pack” che consiste in un chip utilizzabile in dinamica associato ad un dispositivo per il controllo del flusso, dotato di sensori (Figura 22). Questo dispositivo è caratterizzato da due canali di pompaggio per spingere le due soluzioni necessarie al fine di creare il gradiente, e da una rete di svincoli e serpentine. La disposizione piramidale del disegno del chip consente ai due fluidi di dividersi e mescolarsi. La stabilità e il rapporto tra i due liquidi dipendono direttamente dalle portate di ciascun fluido nel canale microfluidico. Questo tipo di chip permette inoltre di creare gradienti stabili a lungo termine. Alcune limitazioni di questo dispositivo consistono nella necessità di un lungo set-up iniziale e nell’esigenza di ulteriori dispositivi di pompaggio per mantenere il flusso.

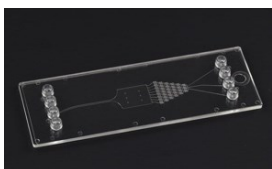


Figura 22- disegno del dispositivo microfluidic chemotaxis assay pilot pack della Elveflow (elveflow.com).

L’azienda Ibidi ha messo in commercio un dispositivo microfluidico, sempre in dinamica, chiamato μ -Slides 3 in 1 (Figura 23). Questo dispositivo è costituito da 3 macrocanali che convergono in uno, permettendo la formazione di un gradiente chemiotattico nel canale centrale. Il canale centrale è caratterizzato da una scala graduata e sfocia in un *reservoir* localizzato nel lato opposto del chip. Come per il precedente, è necessario un sistema di pompaggio supplementare per poter utilizzare il *device* (www.ibidi.com).

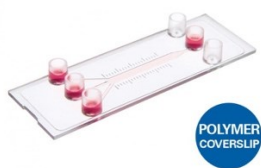


Figura 23- disegno del dispositivo μ -Slides 3 in 1 della Ibidi (ibidi.com).

Comparando il prototipo utilizzato in questa tesi di Laurea a questi due dispositivi commerciali emerge un primo vantaggio a favore del nostro chip: esso non richiede l’utilizzo di pompe accessorie, abbattendo i costi e riducendo la complessità di utilizzo. Inoltre, rispetto al dispositivo commercializzato da Elveflow, il set-up del chip illustrato in questa tesi di Laurea è decisamente meno complesso, permettendo una maggiore *compliance* da parte degli operatori.

Un *device* ingegnerizzato in modo simile a quello riportato in questo lavoro è attualmente commercializzato dalla Darwin microfluidics con il nome di IC-chip (Figura 24). Quest’ultimo è un dispositivo senza flusso

fabbricato in PDMS, analogamente al chip riportato in questo studio. Il IC-chip presenta però diversi macrocanali principali che sono collegati al canale centrale attraverso tre grandi svasature. Il Chip riportato in questa tesi di Laurea invece riporta 61 microcanali (di 250 μm di lunghezza, 10 μm di larghezza e 5 μm di altezza), ingegnerizzati in modo da poter osservare il passaggio di singole cellule, consentendo un tracking preciso e riproducibile dei movimenti chemiotattici e chemiocinetici in *real time*. Inoltre, nel chip descritto in questa tesi di Laurea i 3 canali principali hanno geometrie identiche (500 μm di lunghezza, 6 mm di larghezza, 260 μm di altezza), mentre il chip della Darwin microfluidics presenta canali laterali omogenei di larghezza 3250 μm e altezza 150 μm , mentre quello centrale è largo 1125 μm nella parte più stretta, 3375 μm in quella più ampia, con altezza di 150 μm . Infine il chip della Darwin microfluidics ha reservoir larghi 1mm, mentre i reservoir del chip prototipizzato in questo lavoro sono ampi 6 mm.

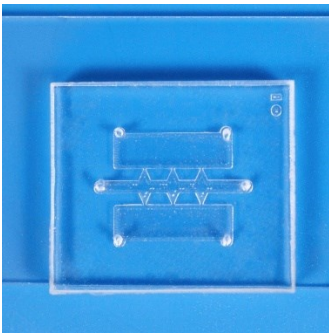


Figura 24- disegno del dispositivo IC-chip della Darwin microfluidics (darwin-microfluidics.com)

In generale, il principale vantaggio del chip presentato in questo studio è rappresentato dalla possibilità di analizzare la chemiotassi sia a livello quantitativo che a livello qualitativo. Altri dispositivi, quali il IC-chip o le camere di Boyden e di Zigmond consentono infatti lo studio della chemiotassi solo da un punto di vista prettamente quantitativo. Considerando che il rationale del nostro studio prevede che il deficit di chemiotassi osservato nelle cellule SDS non è dato da mancanza del recettore per lo stimolo chemioattrattore, ma è dovuto ad un difetto di direzionalità indotta dallo stimolo chemiotattico, un dispositivo in cui si analizza la sola quantità di movimento non è sufficiente. Il chip illustrato in questa tesi di Laurea consente di analizzare la chemochinesi e la chemiotassi in singola cellula, consentendo di apprezzare differenze anche nella direzionalità e nella velocità del movimento cellulare.

Sebbene fosse già stato riportato in letteratura che i neutrofili SDS presentano una diminuzione della frequenza di formazione di pseudopodi ed una riduzione della capacità di cambiamento direzionale¹², finora non era mai stato osservato questo fenomeno in *real-time*.

Uno svantaggio dell'utilizzo del chip in statica è che la generazione del gradiente chemiotattico avviene per semplice diffusione e tende a raggiungere un equilibrio tra i vari compartimenti del chip in un tempo che può essere prestabilito. Una volta raggiunto l'equilibrio il movimento chemiotattico delle cellule si esaurisce. Quindi, al fine di misurare il tempo entro il quale il gradiente raggiunge l'equilibrio, è stato prodotto un esperimento pilota utilizzando destrano marcato con fluoroforo FITC. La diffusione delle molecole di destrano, aventi dimensioni simili a quelle della chemochina IL-8, è stata osservata microscopicamente in esperimenti *time-lapse*. I risultati hanno indicato che il gradiente raggiunge l'equilibrio all'interno dei tre macrocanali del chip in circa 1,5h. Si è stabilito quindi di analizzare la chemiotassi indotta dai vari stimoli entro questo lasso di tempo. Durante le fasi di messa a punto del dispositivo si è preferito utilizzare una linea cellulare di leucociti umani ben nota in letteratura (THP-1, monociti umani) e già utilizzata in precedenti lavori scientifici per lo studio della chemiotassi indotta da stimolo fMLP.

Il prototipo finale riportato in questa tesi di Laurea rappresenta un sistema solido e riproducibile per l'analisi del movimento chemiotattico di leucociti umani. Il prototipo di chemotaxis-on-chip messo a punto in questo lavoro è in grado di discriminare differenze di chemiotassi qualitative e quantitative tra leucociti SDS e normali.

È importante notare che ad oggi non esistono terapie farmacologiche per la SDS, né per le altre sindromi da insufficienza midollare incluse la DBA, la DC e la neutropenia severa congenita (SCN) in grado di contrastare l'insorgenza di mielodisplasia e di leucemie. Tutte le sindromi da insufficienza midollare sono caratterizzate dalla presenza di diverse mutazioni nonsense nei geni associati alle diverse sindromi. Recentemente è stato riportato che il farmaco Ataluren, già commercializzato per il trattamento della DMD, è in grado di generare il *readthrough* del PTC in cellule SDS isolate da pazienti che presentano mutazioni nonsense sul gene *SBDS*, ripristinando l'espressione di proteina SBDS funzionale. Uno degli obiettivi di questa tesi di Laurea era valutare l'effetto di Ataluren sulla chemiotassi in neutrofili SDS. Poiché il farmaco possiede un'ottima efficacia nel ripristino dell'espressione della proteina SBDS *in vitro* in progenitori ematopoietici midollari SDS¹⁶, si è deciso di trattare i progenitori midollari e farli poi differenziare in neutrofili prima dell'analisi chemiotattica. A tal fine i progenitori ematopoietici midollari, isolati attraverso centrifugazioni a gradiente di Ficoll, sono stati messi in coltura in terreno addizionato con G-CSF per indurre la differenziazione neutrofilica. Dopo 24h di trattamento con Ataluren 2.5-5 μ M, le cellule sono state caricate nel chemotaxis-on-chip e analizzate valutando il movimento cellulare indotto dalla stimolazione di una soluzione contenente IL-8 100 ng/ml e fMLP 1 μ M.

I risultati hanno indicato un aumento significativo di FMI nelle cellule trattate con Ataluren rispetto al controllo non trattato. Inoltre, il test di Rayleigh ha confermato il miglioramento di direzionalità delle cellule trattate con il farmaco, mostrando un valore minore di 0.05.

È prevedibile, nell'immediato futuro, l'impegno sistematico del dispositivo ingegnerizzato in questa tesi per lo studio della chemiotassi in leucociti SDS a seguito di diversi trattamenti farmacologici (oltre al già noto Ataluren) in grado di indurre il *readthrough* di PTC, in modo da individuare le molecole più promettenti nel ripristino delle funzioni chemiotattiche cellulari.

Infine, questo studio potrebbe rappresentare una pietra miliare per lo sviluppo successivo di sistemi più complessi che prevedano la bioingegnerizzazione di interi organi su dispositivi microfluidici Organ-on-chip. In tal senso un primo tentativo è già stato condotto all'università di Harvard dal gruppo del professor Ingber, che ha presentato un *bone marrow-on-chip* in grado di mimare in buona parte la condizione SDS. Quest'ultimo presenta però diverse limitazioni, ad esempio l'utilizzo di cellule endoteliali non primarie (HUVEC) e di cellule mesenchimali stromali di midollo isolate da soggetti sani di controllo. Il prototipo pubblicato quindi non è considerabile un modello pienamente SDS. La prospettiva futura è l'ingegnerizzazione di un chip complesso basato sull'utilizzo di colture primarie isolate da biopsie di pazienti come riportato in questa tesi, in grado di mimare in maniera fisiologica il comportamento del microambiente midollare SDS *in vitro*. In questo senso potrebbe essere utile anche l'utilizzo di nuove metodologie ingegneristiche quali il bioprinting 3D per la generazione delle nicchie midollari, simili a quelle presenti *in vivo*, con materiali biocompatibili.

BIBLIOGRAFIA

1. Boocock GR, Morrison JA, Popovic M, et al. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet.* Jan 2003;33(1):97-101. doi:10.1038/ng1062
2. Bezzetti V, Cipolli M. Shwachman-Diamond Syndrome: Molecular Mechanisms and Current Perspectives. *Mol Diagn Ther.* Nov 2018;doi:10.1007/s40291-018-0368-2
3. Tan S, Kermasson L, Hoslin A, et al. EFL1 mutations impair eIF6 release to cause Shwachman-Diamond syndrome. *Blood.* Jul 2019;134(3):277-290. doi:10.1182/blood.2018893404
4. Warren AJ. Molecular basis of the human ribosomopathy Shwachman-Diamond syndrome. *Adv Biol Regul.* Jan 2018;67:109-127. doi:10.1016/j.jbior.2017.09.002
5. Weis F, Giudice E, Churcher M, et al. Mechanism of eIF6 release from the nascent 60S ribosomal subunit. *Nat Struct Mol Biol.* Nov 2015;22(11):914-9. doi:10.1038/nsmb.3112
6. Finch AJ, Hilcenko C, Basse N, et al. Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev.* May 2011;25(9):917-29. doi:10.1101/gad.623011
7. Dror Y, Donadieu J, Koglmeyer J, et al. Draft consensus guidelines for diagnosis and treatment of Shwachman-Diamond syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* Dec 2011;1242:40-55. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06349.x
8. Savage SA, Dufour C. Classical inherited bone marrow failure syndromes with high risk for myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. *Semin Hematol.* 04 2017;54(2):105-114. doi:10.1053/j.seminhematol.2017.04.004
9. Donadieu J, Leblanc T, Bader Meunier B, et al. Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. *Haematologica.* Jan 2005;90(1):45-53.
10. Zhao W, Zhao H, Li M, Huang C. Microfluidic devices for neutrophil chemotaxis studies. *J Transl Med.* 04 15 2020;18(1):168. doi:10.1186/s12967-020-02335-7
11. Orelia C, Kuijpers TW. Shwachman-Diamond syndrome neutrophils have altered chemoattractant-induced F-actin polymerization and polarization characteristics. *Haematologica.* Mar 2009;94(3):409-13. doi:10.3324/haematol.13733
12. Stepanovic V, Wessels D, Goldman FD, Geiger J, Soll DR. The chemotaxis defect of Shwachman-Diamond Syndrome leukocytes. *Cell Motil Cytoskeleton.* Mar 2004;57(3):158-74. doi:10.1002/cm.10164
13. Ryan NJ. Ataluren: first global approval. *Drugs.* Sep 2014;74(14):1709-14. doi:10.1007/s40265-014-0287-4
14. Roy B, Friesen WJ, Tomizawa Y, et al. Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 2016;113(44):12508-12513. doi:10.1073/pnas.1605336113

15. Tutone M, Pibiri I, Lentini L, Pace A, Almerico AM. Deciphering the Nonsense Readthrough Mechanism of Action of Ataluren: An. *ACS Med Chem Lett.* Apr 2019;10(4):522-527.
doi:10.1021/acsmchemlett.8b00558
16. Bezzetti V, Bardelli D, Morini J, et al. Ataluren-driven Restoration of Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome Protein Function in Shwachman-Diamond Syndrome Bone Marrow Cells. *Am J Hematol.* Dec 2017;doi:10.1002/ajh.25025
17. Irimia D. Microfluidic technologies for temporal perturbations of chemotaxis. *Annu Rev Biomed Eng.* Aug 15 2010;12:259-84. doi:10.1146/annurev-bioeng-070909-105241
18. Zigmond SH, Hirsch JG. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J Exp Med.* Feb 01 1973;137(2):387-410.
doi:10.1084/jem.137.2.387
19. Zigmond SH. Orientation chamber in chemotaxis. *Methods Enzymol.* 1988;162:65-72.
doi:10.1016/0076-6879(88)62064-7
20. Keenan TM, Frevert CW, Wu A, Wong V, Folch A. A new method for studying gradient-induced neutrophil desensitization based on an open microfluidic chamber. *Lab Chip.* Jan 07 2010;10(1):116-22.
doi:10.1039/b913494h
21. Hamza B, Irimia D. Whole blood human neutrophil trafficking in a microfluidic model of infection and inflammation. *Lab Chip.* Jun 21 2015;15(12):2625-33. doi:10.1039/c5lc00245a

RINGRAZIAMENTI

Grazie al mio professore Valentino Bezzeri che mi ha seguito ed ha contribuito ad ogni parte di questa tesi e che insieme alle sue collaboratrici Martina e Martina mi ha fatto fare un tirocinio più che appassionante nonostante fossi un pesce fuor d'acqua.

Grazie a Nora che mi ha trasmesso il suo sapere con la minuziosità di una mentore e la leggerezza di un'amica, seguendomi in ogni singolo passo.

Grazie ad Alessandro Polini per aver dato il suo contributo in questa tesi.

Grazie alla relatrice Laura Burattini per la fiducia nel lavoro svolto da me e dal professor Bezzeri.

Ringrazio i miei genitori per avermi dato questa possibilità e per avermi appoggiato in ogni mia scelta e in ogni momento, positivo o negativo che fosse.

Ringrazio mia sorella per avermi sostenuto quando andava bene e per avermi ricordato che non ero l'unica a cui andava male e che può succedere, e Giovi per tutti gli "in bocca al lupo" e i complimenti che un po' di autostima me la facevano salire.

Ringrazio le mie cugine e mia zia per avermi incitato e aver condiviso con me le emozioni ad ogni piccolo passo che facevo.

Ringrazio i miei nonni materni per avermi cresciuto con tutto l'amore possibile e quelli paterni per avermi fatto sentire un po' la piccola Heidi che non guasta mai e anche se non ci capivano niente per loro ero sempre bravissima.

Ringrazio i miei compagni di corso per aver sopportato ogni mia degenerazione e soprattutto la Martina che mi ha aiutato nelle situazioni più disperate con una bella dose di studio ma soprattutto di tortellini pasticciati e kebab e senza la quale probabilmente starei ancora cercando la 145/2.

Grazie alle mie amiche, che ci sono sempre state, nonostante i miei periodi solitari e quelli sclerotici, hanno saputo aspettarmi e subirmi.

Grazie a chi mi ha dato la spinta per iniziare, nonostante le maledizioni che ti ho mandato non sarei qui senza quel pranzo.

Infine, grazie a chi ha creduto in me sia come persona sia come studentessa più di quanto io credessi in me stessa quando ancora mi conosceva appena e mi ha inconsapevolmente aiutato, con grande rispetto e pudore, facendomi scoprire cose e sensazioni per me inesistenti. Forse il traguardo più importante per me. Ma soprattutto, ringrazio fortemente il mio orgoglio che nonostante sia la mia più grande croce mi obbliga a portare a termine ciò che inizio e non mi fa mai gettare la spugna.