



Consiglio Nazionale
delle Ricerche

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA

Laurea Magistrale in Bioingegneria

Progetto, sviluppo e simulazione di Organs-On-Chip (OOC) per valutare parametri fluidici e il loro impatto in oncologia

Nabil Farah

Marzo 2022

Relatori: Prof. Francesco Beltrame

Ing. Silvia Scaglione

Correlatrice: Ing. Arianna Fedi

Sommario

Secondo l'AIRC le neoplasie sono la principale causa di mortalità nel mondo. La principale causa di mortalità è legata all'azione di metastasi secondarie diffuse nell'organismo a partire dal sito primario, principalmente via sangue o linfa. Tale azione si manifesta attraverso una proliferazione su un organo bersaglio a distanza, mettendone a rischio funzionalità, spesso essenziali per la vita. Il viaggio delle cellule neoplastiche dal sito primario all'organo bersaglio è soggetto a stress chimico-fisici poco conosciuti. Tra questi nella mia tesi prendo in considerazione lo shear stress emodinamico, quale indicatore principale di alterazione del funzionamento cellulare e quindi di grado di 'malignità'. I modelli in vitro/animali tradizionali o le colture cellulari, spesso non riescono a mimare con accuratezza la fisiologia umana e tendono quindi a riassumere scarsamente la patofisiologia cellulare. Gli Organs-On-Chip sono sempre più considerati come una tecnologia potenzialmente dirompente in ambito medico e capace di risolvere i problemi sopra citati. Si tratta di chip multifluidici tridimensionali per colture cellulari, che simulano le attività biologiche, la meccanica e la risposta fisiologica di interi organi o addirittura di sistemi di organi, quasi un organo in vitro ben rappresentativo di quello in vivo. Per lavorare su questo scenario ai fini del progetto, sviluppo e simulazione di OOC, si è strutturata la tesi in due parti:

1. OOC commerciali e su di essi ho condotto simulazioni su shear stress, velocità, tracciamento particellare, processi diffusivi
2. Progettazione e simulazione di un chip microfluidico, in qualche modo confrontabile, seppure in via ridotta con gli OOC di cui sopra e su di esso ho condotto le stesse simulazioni al fine di arrivare a suggerire qualche indicatore capace di ottenere una qualche forma di valutazione comparativa tra i diversi OOC disponibili, mettendo in luce la necessità di avere un approccio progettuale flessibile e modulare come geometria dei condotti e altri parametri.

Indice

1. Introduzione	4
1.1 Clinical problem	4
1.2 Shear Stress.....	5
1.3 Computational Fluid Dynamics (CFD)	7
1.4 Modelli in vitro: Lab-On-a-Chip (LOC)	9
1.4.1 Chip microfluidici	10
1.4.2 Organs-On-Chip (OOC)	16
2. Materiali e metodi	24
2.1 Implementazione numerica del modello.....	24
2.2 Introduzione a Comsol Multiphysics 5.6.....	24
2.3 Definizione geometria e materiale del modello.....	25
2.4 Definizione fisica del modello.....	26
2.4.1 Flusso laminare	26
2.4.2 Tracciamento particellare	27
2.4.3 Trasporto di specie diluite	28
2.4.4 Mesh	29
2.4.5 Risultati	29
3. Risultati e discussione	31
3.1 Chip microfluidici (simulazioni)	31
3.2 Organs-On-Chip (simulazioni)	40
3.3 Sviluppo device	54
4. Conclusioni	59
5. Bibliografia	61

1.Introduzione

1.1 Clinical problem

La principale causa di morte associata a malattie oncologiche è la metastasi tumorale, ma la comprensione di questo tipo di fenomeni è tutt'altro che approfondita. Durante la diffusione, le cellule tumorali attaccano i tessuti circostanti il tumore primario, intravasano nelle vie sanguigne e linfatiche, vengono trasportate verso altri organi e, dopo essersi adattate al nuovo ambiente, colonizzano e proliferano formando nuove metastasi ^[1]. Poiché la diffusione avviene principalmente per via sanguigna, le cellule tumorali circolanti (CTCs) infiltrate nel sistema vascolare, potenzialmente metastatiche, sono di ovvio interesse di studio ^[2].

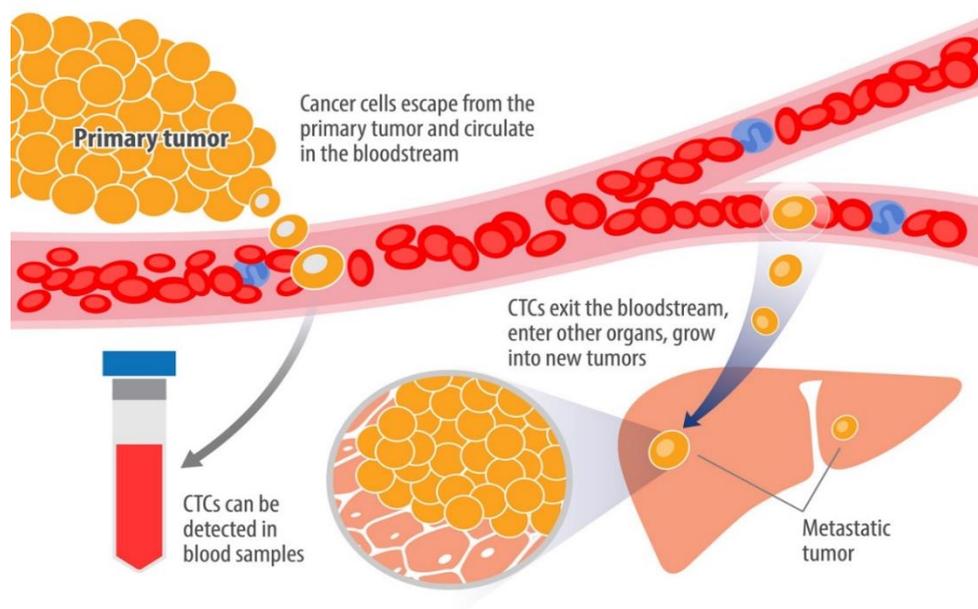


Fig.1: Rappresentazione del percorso delle CTCs, fonte "Crown Bioscience"

Mentre in molti casi, la neoplasia primaria può essere trattata localmente tramite chirurgia o chemioterapia, le metastasi distali rispetto al sito primario risultano

essere molto difficili da trattare e causano in molti casi la morte del paziente [3-5]. La frequenza e il numero di CTCs variano significativamente a seconda del tipo di neoplasia: mentre la maggior parte tumori gastrointestinali rilasciano un piccolo quantitativo di CTCs [6-8], quelli mammari o prostatici ne mettono in circolo grandi quantitativi [9,10]. Non tutte le CTCs sono tuttavia oncogene [11]: nonostante i tumori solidi mettono in circolo milioni di cellule tumorali ogni giorno, non tutte sono causa di nuove metastasi. La rilevanza clinica delle CTCs è pertanto associata ad un sottogruppo, con caratteristiche simili a quelle delle cellule staminali e con la capacità di formare nuove metastasi [12], ma le loro caratteristiche e biologia sono ancora poco chiare.

1.2 Shear Stress

Il viaggio delle cellule neoplastiche dall'organo primario a quello bersaglio è soggetto a diversi stress, sia di tipo chimico che di tipo fisico. I fattori biochimici sono ben noti in letteratura, mentre quelli fisici, rimangono ancora poco chiari. Negli ultimi anni, grazie a nuove tecnologie microfluidiche e strumenti di misurazione sempre più precisi, sono stati fatti grandi passi avanti per la comprensione della fluido-meccanica delle cellule neoplastiche. Sempre più studi indicano lo shear stress fluidico (FSS) come un elemento fondamentale. Il FSS è definito come la forza d'attrito interna tra i diversi strati in movimento di un fluido con flusso laminare [13]. Si può definire matematicamente come:

$$\tau = \mu \dot{\gamma} \quad (1)$$

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dy} \quad (2)$$

con τ shear stress fluidico (misurato in Pa oppure in $dyne/cm^2$), μ viscosità dinamica, $\dot{\gamma}$ shear rate, v velocità di flusso e y distanza tra gli strati interni del fluido. Il FSS ha un ruolo chiave come regolatore dei fenotipi dell'endotelio

vascolare e dell'espressione genica [16], poiché in grado di indurre polarità nelle cellule endoteliali [14] e il riarrangiamento del citoscheletro [15].

Come indicato precedentemente, nonostante milioni di CTCs vengono messe in circolo, solo lo 0.02% sopravvive e provoca nuove metastasi [17]: la causa principale della morte delle CTCs si trova nel danno causato da forze meccaniche, in primis il FSS. I valori medi di FSS nelle vene, capillari ed arterie è di 1-4 dyn/cm², 10-20 dyn/cm² e 4-30 dyn/cm² [18] (vedi Fig.2)

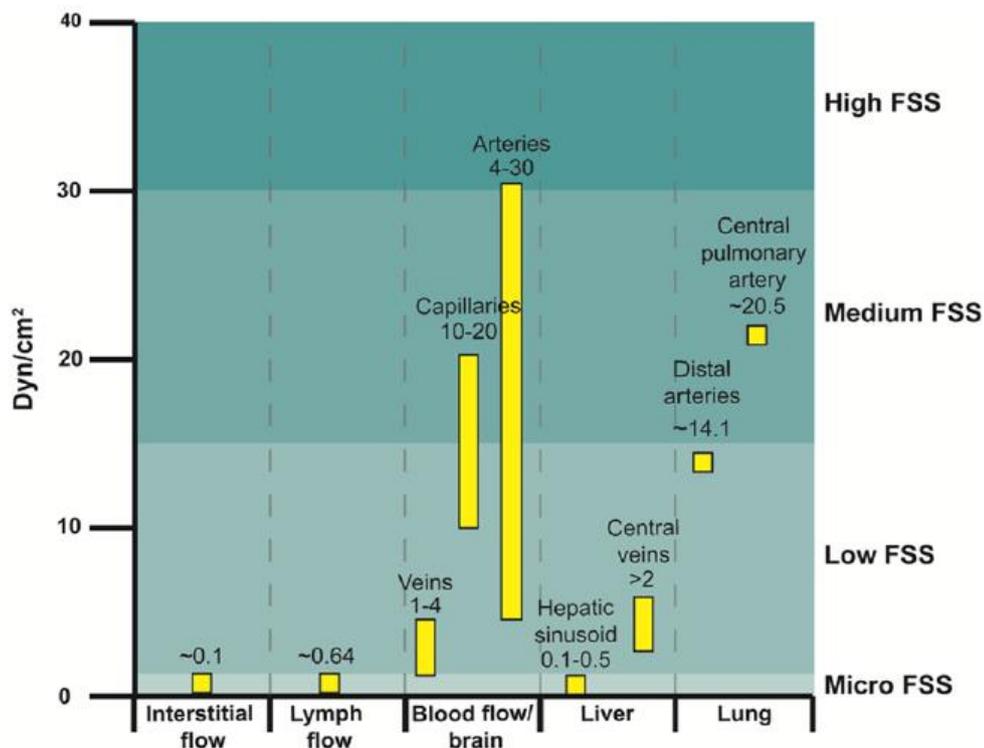


Figura 2: i livelli medi di shear stress variano a seconda del microenvironment [13].

In particolare, il FSS induce l'apoptosi o l'autofagia piuttosto che la necrosi delle cellule tumorali [13]: si è notato che cellule tumorali del colon (linea HCT116) sottoposte a FSS continuo di 8-60 dyn/cm², non vengono danneggiate o distrutte nei primi 2 min, mentre la percentuale di morte cellulare aumenta del 60% dopo 20 h di stimolazione [19]. Alti valori di FSS (60 dyn/cm²) riescono ad eliminare molte più CTC riuscendo ad eliminare più del 90% di cellule tumorali entro le 4

ore di stimolazione e ne inducono l'apoptosi anche dopo 24 h la cessazione dello stimolo [20]. L'apoptosi correlata allo shear stress è attribuita a diversi fattori, in primis la distruzione del citoscheletro, inoltre ad alti valori di FSS è associato un aumento delle specie reattive dell'ossigeno, che possono causare stress ossidativi e indurre la morte delle cellule tumorali [21]. Si è invece notato che stimolando con livelli molto bassi di FSS (2 dyne/cm²), si attivano una serie di citochine che favoriscono la creazione di nuove metastasi [22,23]. In conclusione, il FSS ha un'influenza importante sulla proliferazione, morte e metastatizzazione da parte delle cellule tumorali che varia fortemente a seconda del livello e della durata dello shear stress.

1.3 Computational Fluid Dynamics (CFD)

La *Computational Fluid Dynamics* (CFD) è uno strumento di ormai vasto utilizzo in ingegneria, in molte aree del quale è diventato uno dei metodi principali per la fase di progettazione e di analisi. In bioingegneria si è utilizzata molto la CFD per studiare complessi flussi fisiologici, dimostrandone così l'elevato potenziale clinico [24,25]. Si tratta di uno specifico ramo della matematica e della fluidodinamica in particolare, grazie al quale si riescono a risolvere equazioni differenziali per simulare il moto del fluido. Per flussi di liquidi incompressibili, la maggior parte delle analisi CFD risolvono le equazioni di Navier-Stokes e di continuità, che governano il moto del fluido. Queste equazioni alle derivate parziali non sono lineari e si basano sul principio di conservazione della massa e del momento. Se le geometrie rappresentate sono complesse non è possibile trovare soluzioni analiticamente, per cui applicazioni software specifiche (*CFD solvers*) calcolano soluzioni numeriche approssimate. Soprattutto per i modelli 3D, a causa delle non linearità presenti, l'analisi CFD richiede tempi e potenza computazionali considerevoli. Questo strumento è sempre più utilizzato nell'ambito della medicina cardiovascolare [26,27]: si creano infatti modelli molto complessi per riprodurre su software porzioni del sistema cardiovascolare, sia in condizioni di salute che patologiche (vedi *Fig.3*).

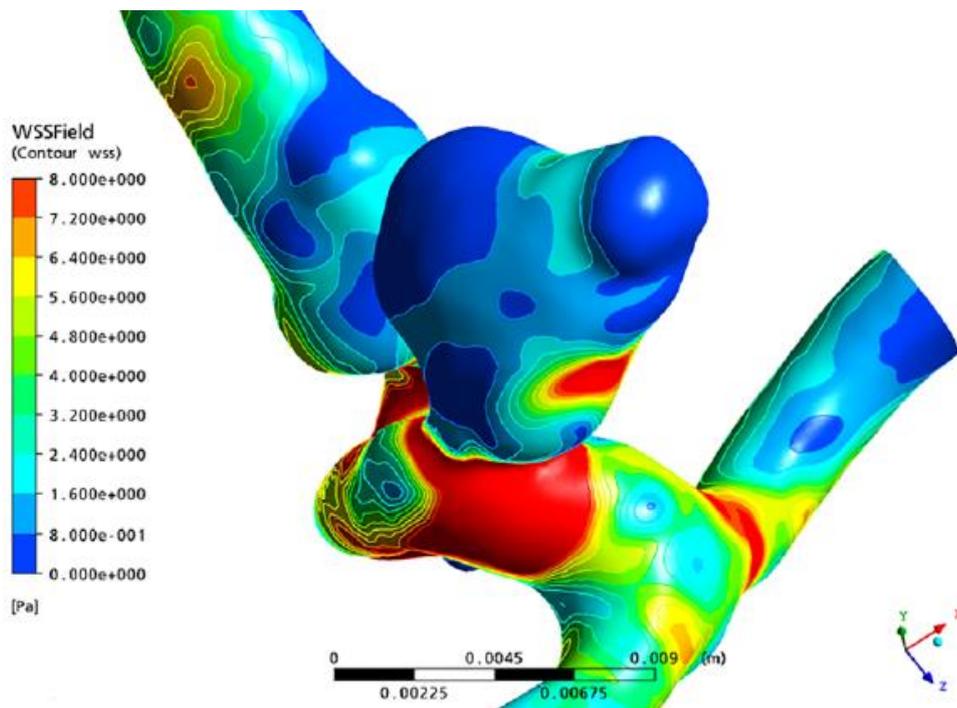


Figura 3: modello CFD di un aneurisma intracranio in cui si mostra graficamente lo shear stress ^[25].

Come vedremo nei prossimi capitoli, l'utilizzo della CFD è fondamentale per la progettazione e analisi delle proprietà fisiche di chips microfluidici e degli Organs-On-Chip, diventati strumenti sempre più fondamentali per la fase di sperimentazione in vitro. In questa tesi, tramite il software *Comsol Multiphysics* 5.6, si utilizza la CFD per le simulazioni di profilo di velocità, shear stress e tracciamento particellare sui vari devices.

1.4 Modelli in vitro: Lab-On-a-Chip (LOC)

I modelli in vitro/animali tradizionali o le colture cellulari, spesso non riescono a mimare con accuratezza la fisiologia umana e tendono quindi a riassumere scarsamente la patofisiologia cellulare. Questa è la principale causa dell'insuccesso dei trial clinici farmacologici, l'alto costo di nuovi farmaci, l'assenza di trattamenti sufficientemente efficaci per alcune malattie e le questioni etiche sollevate legate alla sperimentazione animale. *Lab-on-a-chip* (LOC) è un termine che indica un dispositivo che integra funzioni multiple che si possono svolgere in laboratorio, in un singolo chip che varia da alcuni millimetri a qualche centimetro quadrato di grandezza ed è capace di trattare volumi di fluidi estremamente piccoli, al di sotto dei picolitri [28]. A questa categoria appartengono i più semplici chip microfluidici fino ad arrivare ai più complessi Organs-On-Chip (OOC), entrambi trattati successivamente in questa tesi.

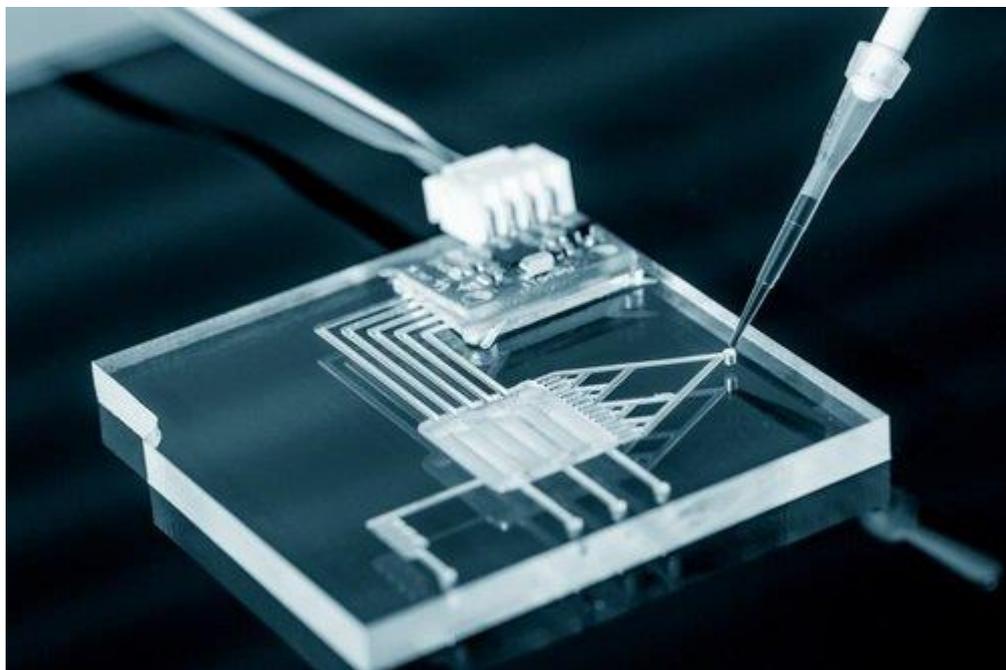


Figura 3: esempio di Lab-On-a-Chip, fonte Biocompare

1.4.1 Chip microfluidici

La *microfluidica* è sia il ramo della scienza che studia il comportamento di fluidi che scorrono lungo canali di dimensioni microscopiche, sia la tecnologia che permette di progettare e creare dispositivi che contengono suddetti canali ^[29]. Un chip microfluidico esplora quindi le proprietà fisiche e chimiche di liquidi e gas su scala microscopica: esso consiste in un pattern di microcanali modellati generalmente tramite *3D-printing*. Questa rete di canali è messa in collegamento con il macro-environment tramite fori di varie dimensioni, attraverso i quali vengono iniettati e raccolti i fluidi che scorrono lungo i canali, grazie all'utilizzo di valvole e pompe (generalmente pompe peristaltiche). Questo tipo di tecnologia offre svariati vantaggi rispetto ai sistemi macroscopici:

- Capacità di analisi e utilizzo di piccole quantità di campioni, cellule e reagenti chimici;
- Possibilità di eseguire molteplici operazioni simultaneamente, grazie alle ridotte dimensioni, diminuendo considerevolmente i tempi di esperimento;
- Eccellente qualità dei dati ricavati ed elevata capacità di controllo dei parametri.

Per la fabbricazione di questo tipo di dispositivi sono largamente utilizzati i polimeri, primi su tutti il PDMS (Polidimetilsilossilano), che grazie alle sue trasparenza ottica, elasticità, bassa tossicità, inerzia chimica e basso costo risulta essere un materiale particolarmente adatto per gli studi cellulari. Tutti i dispositivi trattati in questa tesi sono fabbricati in PDMS. Si esplorano a seguito i vari chip microfluidici nei quali lo shear stress è l'oggetto di studio principale.

Rong Fan et al.^[30] sviluppano un dispositivo microfluidico con lo scopo di studiare la risposta delle CTCs (linea HCT116) a vari livelli di shear stress e di tempo di circolazione.

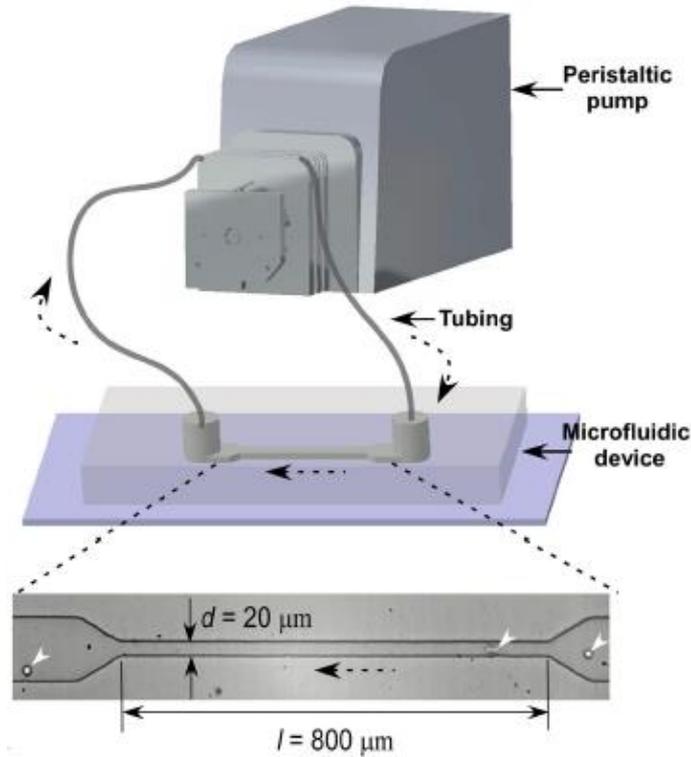


Figura 4: si mostra il device sviluppato da Rong Fan et al., nel quale il fluido viene messo in movimento tramite pompa peristaltica.

Il device, realizzato in PDMS tramite litografia, contiene un unico canale rettilineo di dimensioni simili a quelle delle arteriole ^[31]. Il sistema è messo in circolo tramite una pompa peristaltica, collegata al dispositivo da due tubi in polietilene. I risultati mostrano che, a velocità costante, la vitalità delle cellule diminuisce all'aumentare del tempo di circolazione (vedi Fig.5). Successivamente si sono messe in coltura per 16 h le cellule sopravvissute alla circolazione, monitorandone la proliferazione: si è notato che per tempi di stimolazione brevi la proliferazione non varia significativamente, mentre lunghi tempi di circolazione (20 h) comportano una diminuzione della vitalità cellulare del 65%.

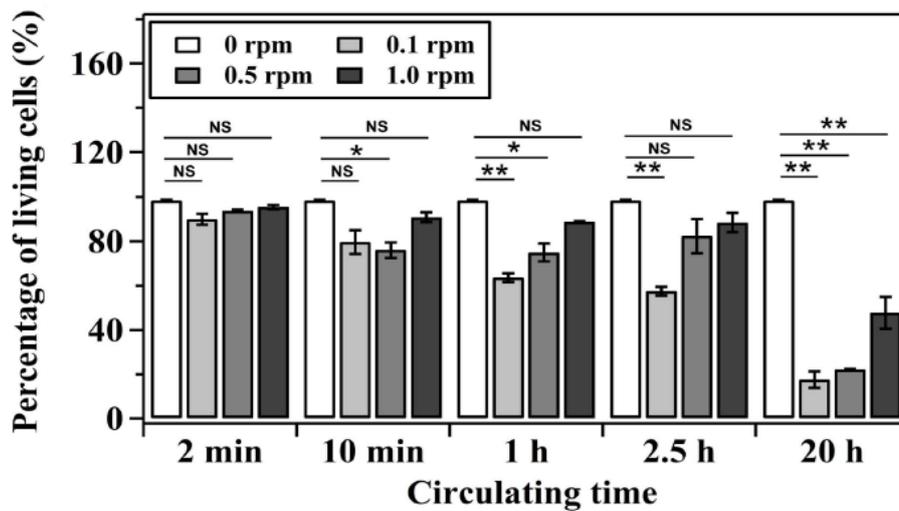


Figura 5: percentuale di cellule in vita dopo un tempo di circolazione di 2 min, 10 min, 1 h, 2.5 h e 20 h a varie velocità peristaltiche (NS = non significativo).

Landwehr et al. [32] hanno invece sviluppato un dispositivo microfluidico capace di isolare e caratterizzare la risposta biofisica allo shear stress delle singole cellule tumorali: questo è reso possibile grazie al peculiare design, che presenta un singolo canale centrale all'interno del quale sono poste delle "micro-trappole" capaci di trattenere le singole cellule messe in circolo tramite pompa peristaltica (vedi Fig. 6).

Questo tipo di approccio, grazie l'utilizzo di tecniche di *dynamic imaging*, permette un'analisi cellulare in tempo reale e non solamente a stimolo terminato. Inoltre, poiché le cellule tumorali sono intrinsecamente diverse tra loro, l'indagine sulle singole cellule permette di comprendere maggiormente come il FSS influenzi i fenotipi delle CTCs [33]. Si sono effettuate simulazioni CFD su *Comsol Multiphysics* per determinare la relazione tra portata in ingresso e FSS lungo il canale. Si è infine studiata la deformazione di due tipi di cellule tumorali del seno (linee MCF7 e MDA-MB-231), dopo averle stimulate con vari livelli di FSS e durate temporali: le cellule MCF7 si deformano maggiormente e più velocemente rispetto alle altre e, poiché si è trovato che le dimensioni cellulari risultano essere irrilevanti ai fini della deformazione, il motivo delle differenze è da cercare nelle

caratteristiche intrinseche della cellula, come la rigidità del citoscheletro o l'espressione genica.

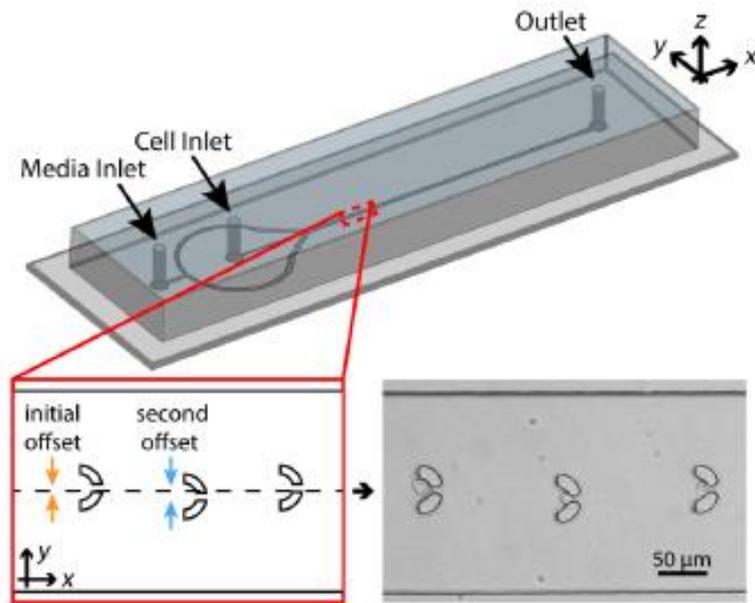


Figura 6: si mostra la struttura del chip microfluidico di Landwehr et al.

Marrella e Fedi^[34] sviluppano invece un device microfluidico multicanale (vedi Fig. 7), capace di riprodurre contemporaneamente i tre livelli di Wall Shear Stress (shear stress alle pareti) caratteristici delle arterie, vene e capillari (20, 5, 2 dyne/cm²).

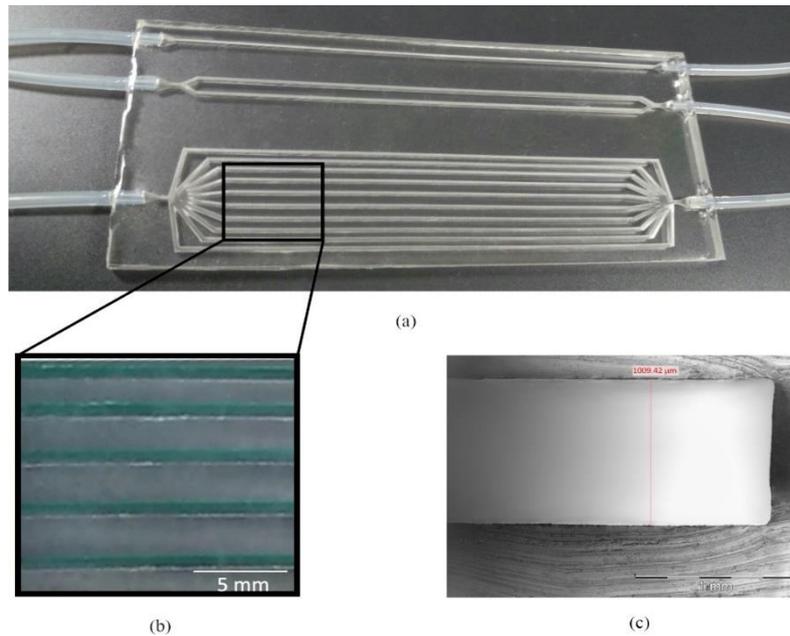


Figura 7: a) si mostra il dispositivo multicanale di Marrella e Fedi^[34]. b) i canali con all'interno colorante per mostrare l'assenza di perdite, c) la sezione di uno dei canali.

Il chip microfluidico presenta 3 set di canali, ognuno con un diverso numero di ramificazioni: queste sono state progettate per ottenere più livelli di shear stress nei 3 diversi circuiti, stabilendo un'unica portata in ingresso comune. Si è calcolato il numero di ramificazioni grazie alla seguente formula:

$$\frac{Q^{in}}{n} = \frac{\tau B H^2}{6\mu} \quad (3)$$

con Q^{in} portata in ingresso, n numero di ramificazioni, τ Wall shear stress nel canale (espresso in dyne/cm²), B e H altezza e larghezza del canale ed infine μ viscosità dinamica (in questo caso dell'acqua). Dopo aver fatto circolare le cellule tumorali (linea MDA-MB-231) per 6 ore, vengono raccolte ed analizzate tramite microscopio a fluorescenza: le cellule sottoposte a WSS più alto, presentano una minor vitalità (vedi Fig. 8).

Si è inoltre studiata la capacità di aggregazione delle CTCs (detta *clusterizzazione*): tramite image post processing si è trovato che all'aumentare dello shear stress, si ha una maggiore la disgregazione dei cluster, fino ad arrivare alla riduzione degli agglomerati del 70%, rispetto al campione di controllo, con stimolazione a 20 dyne/cm².

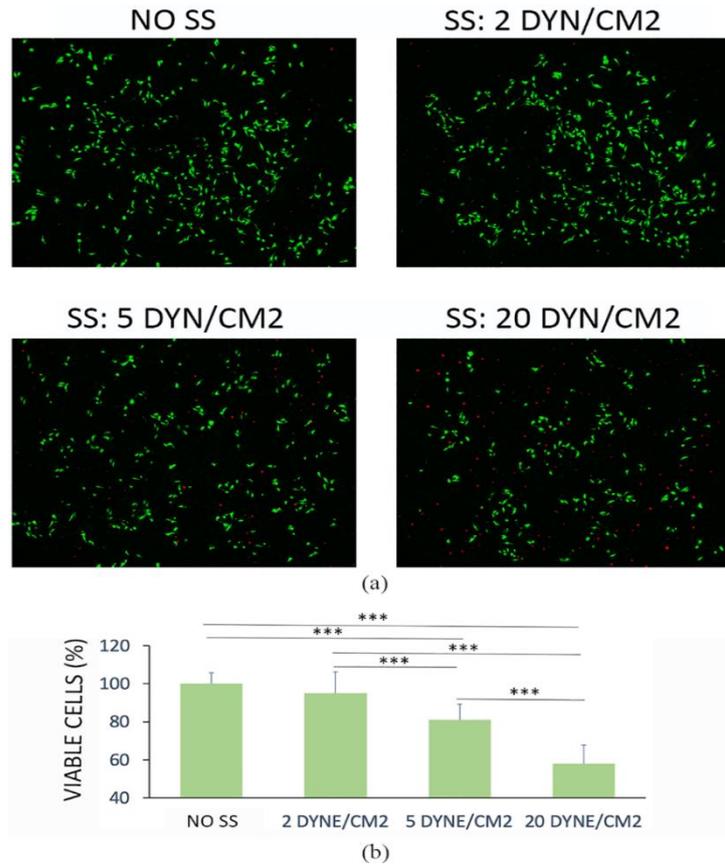


Figura 8: si mostra come la vitalità delle cellule tumorali diminuisca all'aumentare dello shear stress

Questi dispositivi microfluidici, possono rappresentare un buon sistema in vitro per studiare gli effetti dei parametri fisici legati al flusso ematico sulle CTCs, con lo scopo di trovare nuove strategie terapeutiche; data però la loro elevata specificità di studio, in questo tipo di dispositivi manca una rappresentazione più complessa e completa dell'ambiente biologico che ospita le cellule. A seguito è

mostrata un'altra categoria di *Lab-On-Chip* capace di ovviare a questa problematica.

1.4.2 Organs-On-Chip (OOC)

Gli Organs-On-Chip (OOC), conosciuti anche come Microphysiological Systems (MPSs), sono dei microdispositivi per colture cellulari 3D con lo scopo di riprodurre le funzioni chiave di organi viventi su un chip computerizzato. Questo tipo di dispositivo microfluidico è più efficiente delle tecniche di coltura cellulare standard, poiché è capace di riprodurre complessi ambienti cellulari, così come la loro influenza sulle funzioni dell'organo in questione. Tutto ciò permette di indagare la fisiologia umana per specifici organi e creare modelli più completi di patologie. Gli OOC utilizzano la microfluidica e le tecniche di microfabbricazione per meglio replicare le funzionalità degli organi: tra di essi si possono trovare modelli come gut-on-chip, heart-on-chip, lung-on-chip, tumor-on chip e molti altri. Data la scalabilità di questi sistemi, è possibile interconnettere più Organs-On-Chip per studiare le interazioni tra più apparati, riuscendo quindi a riprodurre la maggiore complessità del corpo umano.

A seguito sono mostrati gli OOC di riferimento al giorno d'oggi e la loro azienda produttrice, con annesso caso di studio.

HUMIMIC Chip2 (TissUse)

L'azienda tedesca *Tissuse* produce *Multi-Organ-Chips* largamente utilizzati in campo farmacologico, cosmetico e alimentare fin dal 2012 ^[35]. Le piattaforme *Multi-Organ-Chips* consistono in dispositivi miniaturizzati che simulano l'attività e l'interazione di più organi. Si prende in considerazione il device *HUMIMIC Chip2* (vedi *Fig. 9*): questo dispositivo permette la coltura simultanea di due modelli di organi differenti, messi in collegamento da canali microfluidici. Un

sistema di valvole permette il collegamento ad una pompa, l'approvvigionamento di nutrienti e di ossigeno per le cellule.



Figura 9: si mostra il chip sviluppato dall'azienda TissUse.

Hübner et al ^[36] utilizzano il dispositivo sopracitato per studiare gli effetti indesiderati degli anticorpi monoclonali, utilizzati nelle terapie antitumorali, sulla pelle. Gli anticorpi monoclonali, in questo caso di studio il *Cetuximab*, vanno ad agire su recettori per fattori di crescita epiteliale (EGFR) e questo comporta da una parte un'espressione maggiore dei geni pro-apoptotici nei tessuti tumorali, dall'altra il danneggiamento del tessuto epiteliale, in particolare l'eliminazione dei cheratinociti dello strato basale della pelle. Nel dispositivo vi sono due circuiti separati (uno con il *Cetuximab* in circolo e un altro di controllo), ognuno formato da due pozzetti messi in collegamento da microcanali, nei quali vengono messe in coltura separatamente cellule epiteliali e cellule tumorali polmonari (linea H292) (vedi Fig. 10).

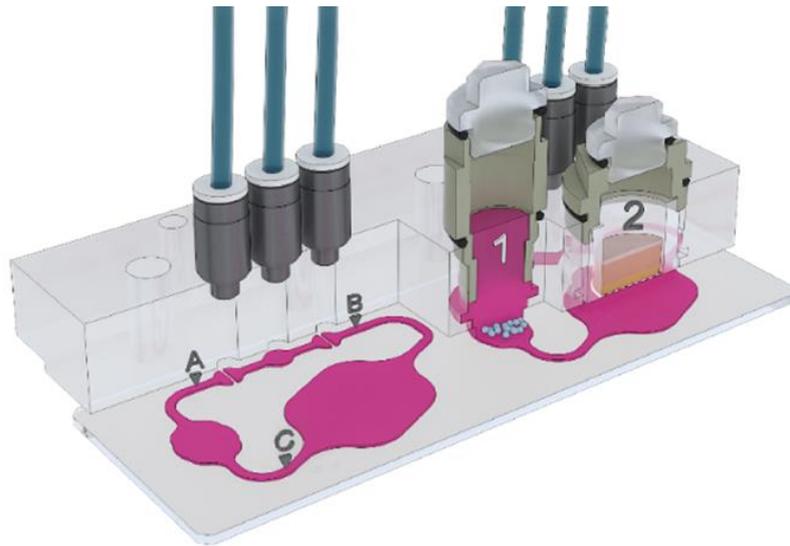


Figura 10: si mostra la sezione trasversale del dispositivo prodotto da TissUse. La sezione di destra mostra il compartimento tumorale (1) e quello epiteliale (2). Le dimensioni dei pozzetti sono quelle dei classici 24 e 96-well.

Si è dapprima valutata l'efficacia del Cetuximab come farmaco antitumorale: esso si lega al dominio extracellulare del EGFR, che induce l'internalizzazione del recettore e la sua degradazione, causando l'inibizione della proliferazione e l'induzione apoptotica nelle cellule tumorali ^[37]. Le terapie che utilizzano questo tipo di meccanismo (EGFR-targeted therapies) hanno comunemente effetti indesiderati sulla pelle del paziente, come secchezza, prurito o addirittura infezioni ^[38]. Utilizzando questo modello di co-cultura si riescono a rilevare molti danni collaterali alla pelle sin dai primi test *in vitro*: tramite la microscopia in fluorescenza si è notato un danno considerevole nell'arrangiamento dello strato epiteliale basale, dovuto alla mancanza di colonne di cheratinociti in quest'ultimo strato. (vedi *Fig.11*).

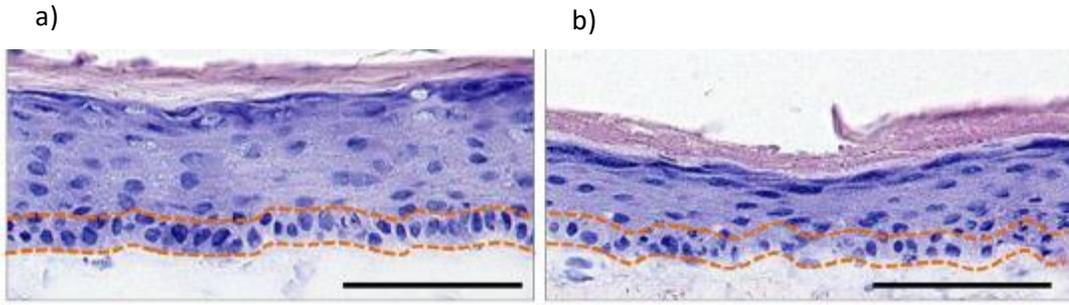


Figura 11: a) si mostra il tessuto epiteliale sano; b) tessuto con effetti collaterali dovuti al trattamento con anticorpi monoclonali

Quindi, grazie a questo tipo di piattaforma, si introducono molte possibilità di combinazione tra organi oltre a quella presentata, riuscendo a comprenderne meglio l'influenza e le risposte biologiche reciproche.

IdenTx 3 Chip (Aimbiotech)

L'azienda Aimbiotech produce una serie di chips per lo studio dei processi di intravasazione delle cellule tumorali nel flusso ematico attraverso l'endotelio.

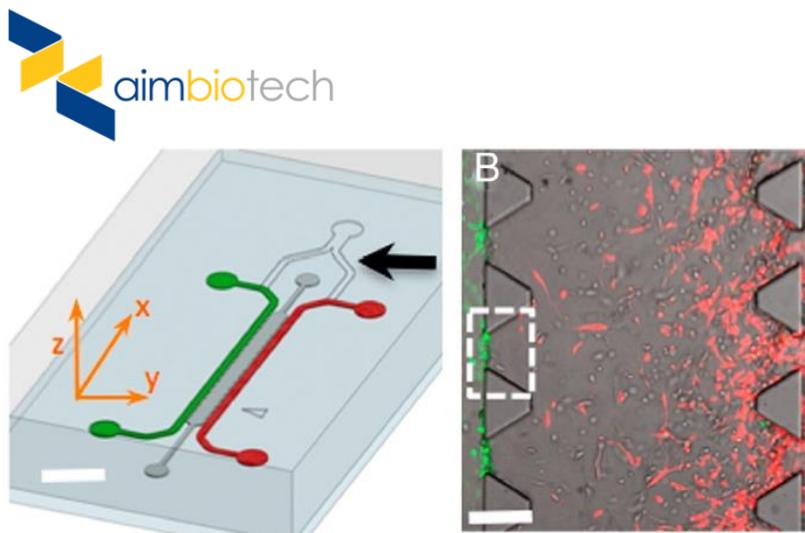


Figura 12: si mostra il device di Aimbiotech: il canale in verde presenta al suo interno cellule epiteliali, mentre quello in rosso presenta cellule tumorali ^[39]. I canali sono larghi 500 μm , lunghi 20 mm e alti 120 μm (Barra di riferimento: 2mm).

Questo processo risulta essere cruciale per la comprensione del fenomeno delle CTCs. *IdenTx 3 Chip* fa parte della suddetta famiglia ed è formato da 3 canali, due laterali e uno centrale: nei canali laterali sono disposti rispettivamente strati di cellule endoteliali e cellule tumorali in soluzione, mentre in quello centrale è posto un hydrogel, con il ruolo di mimare la funzione della matrice extracellulare (vedi *Fig.12*).

Zervantonakis et al ^[39] utilizzando questo chip, creano un modello in vitro 3D dell'interfaccia tumorale-vascolare: si esplora la relazione tra intravasazione delle cellule tumorali del seno e permeabilità dell'endotelio e come quest'ultima vari con la presenza di macrofagi e con la stimolazione tramite $TNF-\alpha$ (citochina coinvolta nell'infiammazione sistemica, prodotta dagli stessi macrofagi).

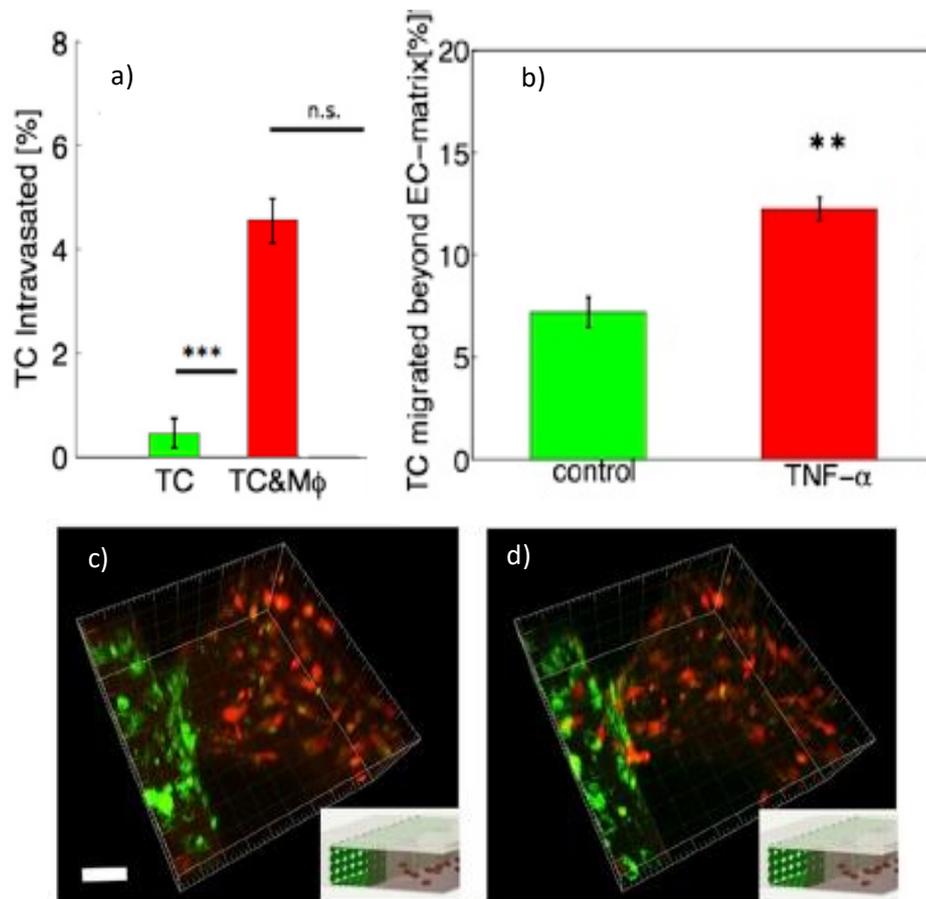


Figura 13: a) grafico che mostra la percentuale di cellule tumorali (TC) intravasate in assenza (verde) e in presenza di macrofagi (rosso); b) percentuale TC in assenza di stimolazione (verde) e con stimolazione tramite $TNF-\alpha$ (rosso); c) migrazione delle cellule tumorali (in rosso) verso quelle endoteliali al tempo $t=0$; d) $t=10$ h ^[39].

L'intravasazione è valutata come il numero di cellule tumorali che, una volta attraversata la matrice 3D e lo strato endoteliale si sedimentano sulla superficie apicale di quest'ultimo. I risultati mostrano che l'intravasazione è un fenomeno raro in condizioni standard, mentre in presenza di macrofagi una maggiore percentuale di cellule tumorali riesce ad attraversare l'endotelio; stimolando inoltre con TNF- α , secreta dagli stessi macrofagi, la percentuale di CTCs a superare la barriera endoteliale si innalza ulteriormente (vedi *Fig.13*). Si suppone che la presenza di macrofagi e di TNF- α aumenti l'invasività delle cellule tumorali, mentre l'aumento della permeabilità potrebbe essere dovuto ad un riarrangiamento delle cellule della barriera endoteliale.

Emulate

L'azienda statunitense *Emulate* produce diversi chip che mimano le funzioni di molti tipi organi, dal cuore al fegato, fino ad arrivare muscoli. Si prende in considerazione un modello che ricrea l'interfaccia capillare-alveolare: il chip in questione è costituito da un canale centrale, a metà del quale è posta una sottile lastra forata, e da due canali laterali (vedi *Fig.14*). Vengono quindi coltivate cellule polmonari endoteliali e cellule epiteliali alveolari sui due lati opposti della piastra forata, facendo infine passare aria nella camera superiore mentre in quella inferiore medium con vari tipi di cellule (anche tumorali) o farmaci. Nei due condotti laterali si crea quindi il vuoto e grazie all'utilizzo di pompe si fanno dilatare e contrarre questi ultimi, che causano la deformazione oscillatoria delle pareti del canale centrale, ricreando così il processo di respirazione.

1. Epithelial Channel
2. Human Epithelial Cells
3. Vacuum Channel
4. Membrane
5. Human Endothelial Cells
6. Endothelial Channel

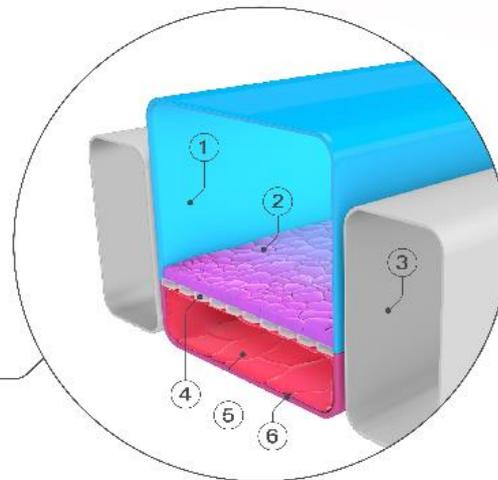


Figura 14: si mostra lo schema del Lung-on-Chip sviluppato da Emulate, fonte: <https://www.cbc.devcom.army.mil/solutions-newsletter/army-applies-lung-on-a-chip-technology-to-covid-19-research/>

Huh et al ^[40] utilizzano questo device per studiare il fenomeno dell'edema polmonare come effetto avverso all'interleukina-2 (IL-2), citochina utilizzata nel trattamento di pazienti tumorali. Per sviluppare questo modello si è quindi perfusa IL-2 nel canale inferiore del device, con successiva analisi tramite microscopio a contrasto di fase: le immagini hanno rivelato perdite di liquido, il quale ha attraversato la barriera endoteliale, riversandosi nel compartimento riempito ad aria (vedi *Fig.15*). Queste perdite sono perdurate per tutto il periodo dell'esperimento (4 giorni), causando una progressiva riduzione del volume di aria, finché il microcanale alveolare non è stato completamente allagato. Come mostrato in *Fig.15*, la permeabilità della barriera endoteliale risulta essere maggiore in presenza di IL-2, aumentando ulteriormente quando si applicano stress meccanici, in questo caso la deformazione oscillatoria dovuta alla respirazione.

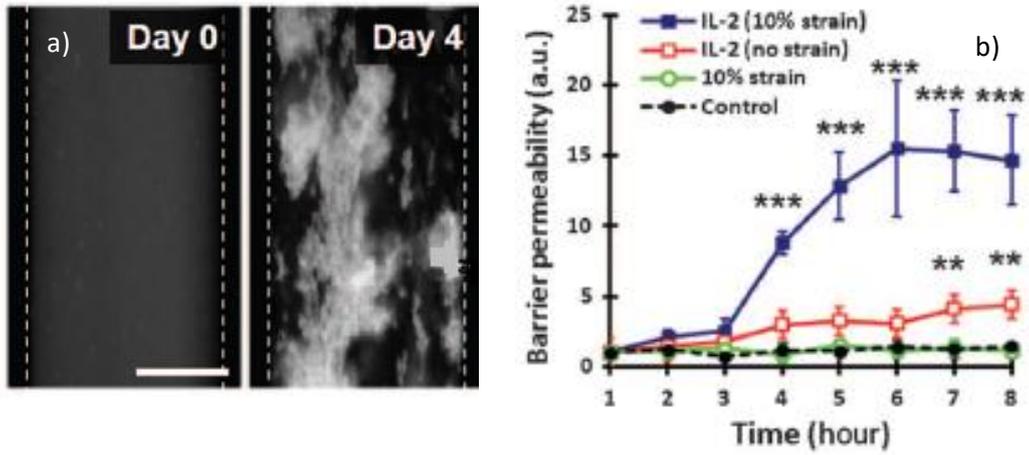


Figura 15: a) si mostra la perdita di medium cellulare all'interno del canale alveolare al giorno 0 e al giorno 4; b) si mostra la variazione di permeabilità in presenza IL-2 e di deformazione della barriera ^[40].

2. Materiali e metodi

2.1 Implementazione numerica del modello

I modelli presentati sono stati implementati attraverso *Comsol Multiphysics 5.6*, un software commerciale-scientifico che permette simulazioni multi-fisiche attraverso l'accoppiamento di una o più fisiche all'interno dello stesso modello. È quindi possibile implementare modelli che richiedono la risoluzione di più fisiche simultaneamente. Permette di risolvere problemi ingegneristici e scientifici basati su equazioni differenziali alle derivate parziali (PDE). Per risolvere i modelli, *Comsol Multiphysics* utilizza la metodologia agli elementi finiti (FEM). L'implementazione del modello in *Comsol Multiphysics* ha permesso di riprodurre l'esperienza sperimentale riportata nel *Capitolo 3* attraverso delle simulazioni. In questo Capitolo si evidenziano pertanto le principali scelte effettuate per implementare le simulazioni.

2.2 Introduzione a Comsol Multiphysics 5.6

La prima selezione da fare in *Comsol Multiphysics* è scegliere la dimensione spaziale della simulazione: 3D, 2D assial-simmetrico, 2D, 1D assial-simmetrico, 1D, 0D. Successivamente è possibile scegliere la fisica del modello teorico che si intende implementare. È possibile accoppiare più modelli fisici per descrivere il modello teorico globale o scegliere il modello in uno step successivo. L'ultimo passo, prima di procedere con l'inserimento dei dati e con l'assegnazione delle condizioni al contorno e delle condizioni iniziali, consiste nel decidere il tipo di studio che si vuole condurre, per esempio stazionario (*stationary*) o dipendente dal tempo (*time dependent*). Nei casi in esame è stato scelto di lavorare in 3D e di condurre studi stazionari per i profili di velocità e shear stress, mentre per

tracciamento particellare e processi diffusivi si è scelto lo studio dipendente dal tempo.

2.3 Definizione geometria e materiale del modello

Prima di procedere alla definizione finale del modello, viene definita la geometria. È possibile utilizzare forme predefinite nel software, o combinazione di esse, oppure importare la geometria da un file esterno. Nei casi in esame la geometria è stata disegnata utilizzando le forme predefinite del software.

Successivamente si procede con la definizione dei materiali di cui è composta la geometria: è possibile scegliere all'interno della libreria un materiale esistente o definirne uno da nuovo. La scelta del materiale serve a definire le proprietà dello stesso e fornire al sistema i parametri necessari per lo svolgimento delle simulazioni. Per gli studi di fluidodinamica è necessario indicare le seguenti proprietà:

- Densità [kg/m^3]
- Viscosità dinamica [$\text{Pa}\cdot\text{s}$]

Per gli studi effettuati si sono scelti i seguenti materiali:

- Acqua, per le simulazioni fluidodinamiche;
- Hydrogel, per le simulazioni fluidodinamiche nel device di AimBiotech (*Cap. 3.2*);
- PDMS, come materiale per le geometrie definite;

L'unico materiale i cui parametri sono stati definiti da utente è l'hydrogel, con valori di densità = 1270 kg/m^3 e viscosità dinamica = $40 \text{ Pa}\cdot\text{s}$; gli altri materiali sono stati selezionati dalla libreria del software.

2.4 Definizione fisica del modello

Per definire il modello teorico globale all'interno del nostro software usato per la simulazione si accoppiano più modelli fisici: *Laminar flow (spf)*, *Particle tracing for fluid flow (fpt)* e *Transport of Diluted Species (tds)* (quest'ultimo solo nel device sviluppato da AimBiotech).

2.4.1 *Flusso laminare*

L'interfaccia *Laminar Flow* viene utilizzata per modellare un fluido monofasico in regime di flusso laminare utilizzando l'equazione di continuità e quella di Navier-Stokes. Comsol Multiphysics 5.6 per descrivere un flusso laminare utilizza le seguenti equazioni generiche:

$$\rho \frac{\partial u}{\partial t} + \rho(u \cdot \nabla)u = [-pI + \mu(\nabla u + (\nabla u)^T)] + F \quad (4)$$

$$\rho \nabla \cdot u = 0 \quad (5)$$

Dove ρ è la densità del fluido, u è il campo di velocità, p è la pressione interna del fluido, μ è la viscosità del fluido e F il termine che raggruppa le forze esterne, nel nostro caso forza di volume. Le equazioni subiscono o meno delle semplificazioni a seconda degli input inseriti dall'utente nel software: per esempio è possibile scegliere, come nel nostro caso, di considerare il fluido incompressibile con conseguente semplificazione delle equazioni. Le equazioni subiscono anche delle variazioni a seconda del tipo di studio, se è stazionario o dipendente dal tempo.

All'interno dell'interfaccia *Laminar Flow* è possibile inserire delle sezioni che permettono di adattare il modello predefinito in *Comsol Multiphysics* ai modelli teorici; in particolare le sezioni inserite sono le seguenti: proprietà del fluido

(*Fluid Properties*), proprietà alla parete (*Wall*), valori iniziali (*Initial Values*), condizioni al contorno in ingresso (*Inlet*), condizioni al contorno in uscita (*Outlet*). All'interno di *Fluid Properties* si inseriscono i parametri che definiscono le proprietà del fluido, in questo caso si impone che vengano ricavate dal materiale precedentemente definito, mentre per tutti gli studi si è scelta una temperatura di default di 20°C e pressione di 1 atm. Le proprietà alla parete vengono definite nel campo *Wall*. In questa sezione devono essere definite le pareti esterne e viene definita la condizione al contorno, in questo caso condizione di non scivolamento. Le condizioni iniziali sono definite nulle. Per ciò che riguarda l'*Inlet* viene scelta la parete di ingresso del fluido, la condizione (*Fully developed flow*) e il valore di portata in ingresso. Si sceglie infine la parete di uscita del fluido (*Outlet*), con condizione di pressione nulla.

2.4.2 *Tracciamento particellare*

Il *Particle Tracing Module* permette di calcolare la traiettoria delle particelle in un fluido includendo interazioni particella-particella e particella-campo. *Comsol Multiphysics* per descrivere il tracciamento particellare utilizza la seguente equazione generica (per ogni particella):

$$F_t = \frac{d(m_p \cdot v)}{dt} \quad (6)$$

con F_t forza, m_p massa e v campo di velocità della particella. Si sceglie inoltre una formulazione di tipo Newtoniano che definisce le equazioni del secondo ordine per i componenti del vettore posizione di ogni particella. Le sezioni inserite all'interno dell'interfaccia *Particle tracing* sono le seguenti: proprietà della particella (*Particle properties*), pareti (*Wall*), parete di ingresso e di uscita (*Inlet* e *Outlet*). All'interno di *Particle properties* si inseriscono i parametri che definiscono le proprietà della particella: densità (definita 1080 kg/m³), diametro (definito 20 μm) e carica della particella (nulla). Nella sezione *Wall* vengono definite le pareti del condotto e la condizione al contorno, in questo caso di

rimbalzo. All'interno della sezione *Inlet* si definisce l'ingresso del condotto e le sue condizioni: tempi di rilascio nel tempo (definito a zero) e numero di particelle per rilascio (50 ÷ 100 particelle); inoltre si sceglie che le particelle seguano il campo di velocità calcolato nello studio precedente del flusso laminare. Si definisce quindi l'*Outlet* e si sceglie l'opzione di svanimento della particella quando quest'ultimo viene raggiunto. Si sono inoltre aggiunti due tipi di forza, al fine di rendere il modello più completo:

- *Drag force* (forza di trascinamento) definita dalle seguenti equazioni:

$$F_d = \frac{1}{\tau_p} m_p (u - v) \quad (7)$$

$$\tau_p = \frac{d_p^2 \rho_p}{18\mu} \quad (8)$$

- *Gravity force* (forza di gravità) definita dalla seguente equazione:

$$F_g = m_p g \frac{\rho_p - \rho}{\rho_p} \quad (9)$$

con τ_p costante di tempo, m_p massa della particella, u velocità del mezzo, v velocità della particella, d_p diametro della particella, ρ_p densità della particella, μ viscosità del mezzo, g accelerazione di gravità e ρ densità del mezzo.

2.4.3 Trasporto di specie diluite

Questo tipo di studio permette di calcolare il campo di concentrazione di un soluto diluito all'interno di un solvente, nel nostro caso acqua. *Comsol Multiphysics* utilizza le leggi di Fick:

$$\nabla \cdot J_i + u \cdot \nabla c_i = R_i \quad (10)$$

$$J_i = -D_i \nabla c_i \quad (11)$$

con J_i densità di flusso della specie, u campo di velocità del mezzo, c_i concentrazione molare della specie, R_i flusso risultante e D_i coefficiente di diffusività. Questo tipo di studio è di tipo bidimensionale, in quanto per ridurre la complessità di calcolo si è svolto su una sezione ortogonale del device. Le sezioni inserite all'interno dell'interfaccia *Transport of Diluted Species* sono le seguenti: proprietà di trasporto (*Transport Properties*), valori iniziali (*Initial Values*) e concentrazione della specie. All'interno della sezione *Transport Properties* si definisce la temperatura ($T = 20^\circ\text{C}$ conforme con le simulazioni precedenti), il campo di velocità (definito dalle simulazioni in *Laminar Flow*), il coefficiente di diffusione (si sceglie $D_c = 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$) e il tipo di diffusione, in questo caso isotropica. Si definisce infine la concentrazione della specie, definita 1mM.

2.4.4 Mesh

La forma delle celle del mesh è triangolare. È stata scelto un mesh non uniforme: celle più piccole in corrispondenza dei vertici. Questo per avere una soluzione più precisa in corrispondenza soprattutto degli angoli, nel quale si ha un cambiamento più drastico dei campi di velocità, shear stress e flusso particellare.

2.4.5 Risultati

I risultati trovati con la simulazione in Comsol Multiphysics 5.6 sono:

- Profilo di velocità del fluido
- Shear Stress

- Traiettorie delle particelle
- Concentrazione

Il profilo di velocità è stato ottenuto creando un grafico all'interno della sezione *2D Plot Group* e scegliendo il tipo di visualizzazione *Slice*, che permette di visualizzare la distribuzione su piani orientati (si scelgono piani ortogonali al canale). Si definisce il FSS manualmente, come prodotto shear rate (definita a partire dal campo di velocità) e viscosità del mezzo; anche in questo caso si crea un grafico all'interno della sezione *2D Plot Group*, con tipo di visualizzazione *Slice*. Per le traiettorie delle particelle si sceglie il tipo di visualizzazione *Streamline*, il quale traccia le linee delle traiettorie di tutte le particelle. Si sceglie infine una visualizzazione di tipo video per la diffusione della specie diluita nel tempo.

3. Risultati e discussione

In questo capitolo sono riportati i risultati delle simulazioni svolte su *Comsol Multiphysics*: si sono riprodotte le geometrie dei device presentati nei capitoli precedenti (1.4.1-1.4.2) ed effettuate le simulazioni spiegate nel *Cap.2*, infine si è progettato un nuovo chip microfluidico per l'analisi del FSS. In tutte le simulazioni si sono riprodotti i valori di riferimento di FSS nelle arterie, vene e capillari (20-5-2 dyne/cm²).

3.1 Chip microfluidici (simulazioni)

Si è riprodotto inizialmente il device studiato da *Rong Fan et al* ^[30], mostrato in *Fig.16*.

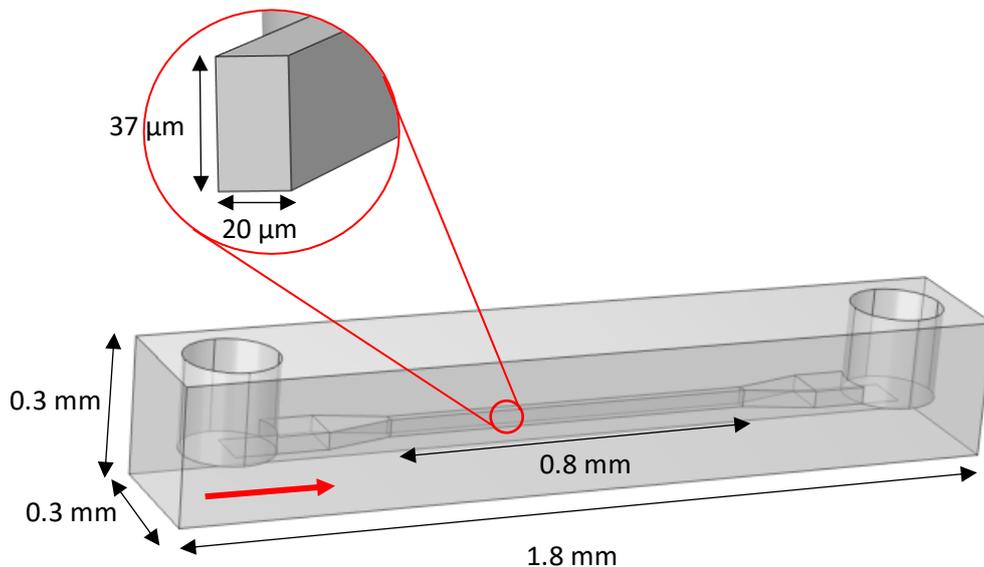


Figura 16: si mostra il chip microfluidico riprodotto su Comsol Multiphysics 5.6, con le dimensioni indicate, in rosso la direzione del flusso.

Il WSS segue un andamento lineare al variare della portata in ingresso: per ottenere i valori di SS paragonabili a quelli biologici, in ingresso bisogna imporre portate dell'ordine dei decimi di $\mu\text{l}/\text{min}$. La distribuzione del FSS risulta essere leggermente minore ai capi del canale, andando poi ad uniformarsi verso il centro. Come si vedrà in tutte le simulazioni successive (anche degli altri device), nelle sezioni trasversali il FSS alle pareti, definito come Wall Shear Stress (WSS) risulta essere più elevato rispetto al centro del condotto (*Fig.17*).

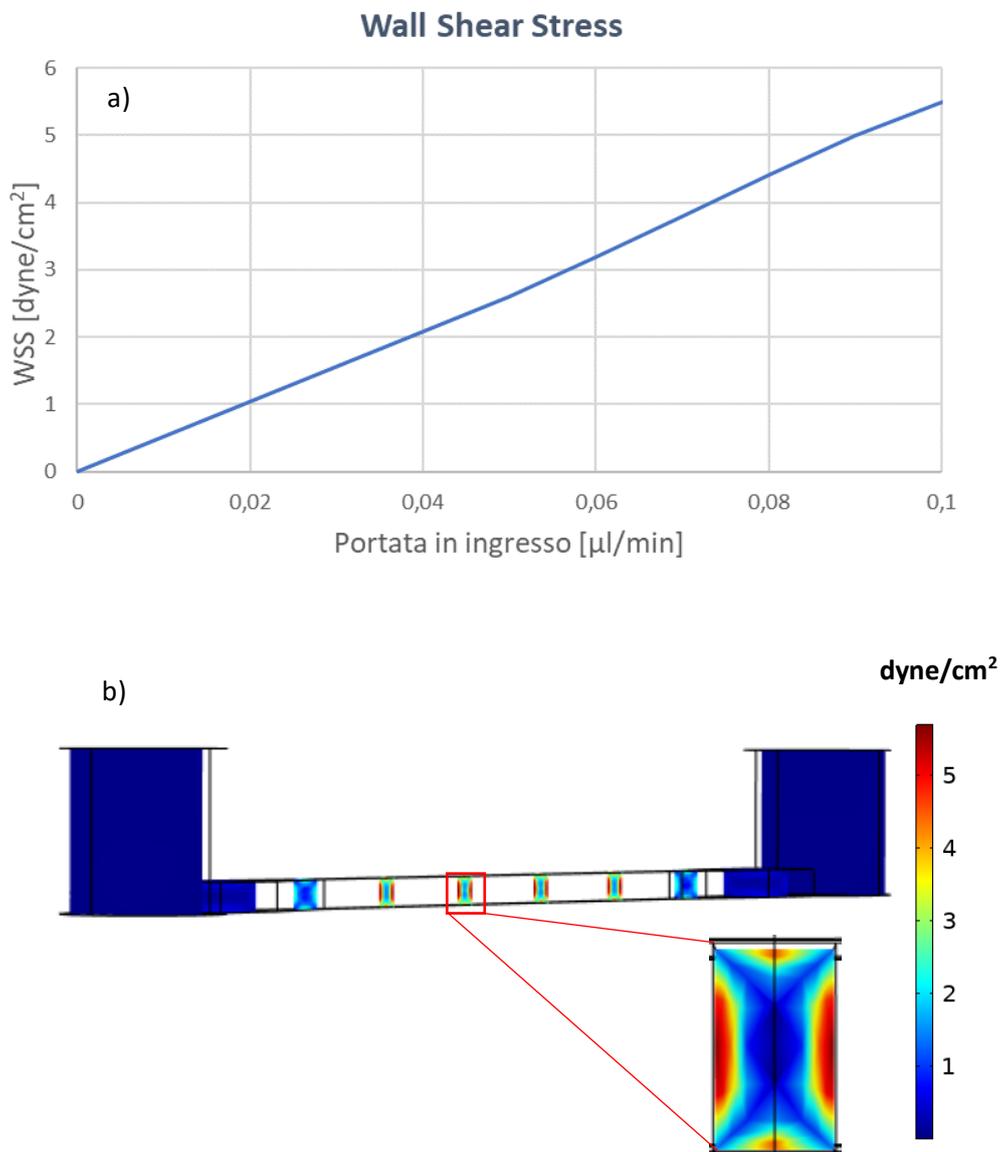


Figura 17: a) il grafico che mostra l'andamento del WSS al variare della portata in ingresso; b) si mostra la distribuzione del SS sui piani trasversali (input $0.1 \mu\text{l}/\text{min}$)

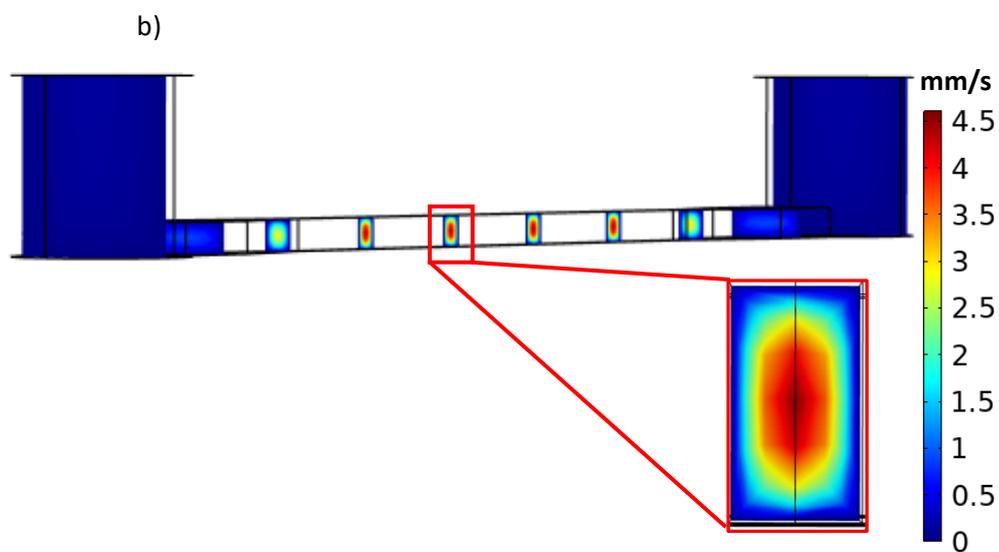
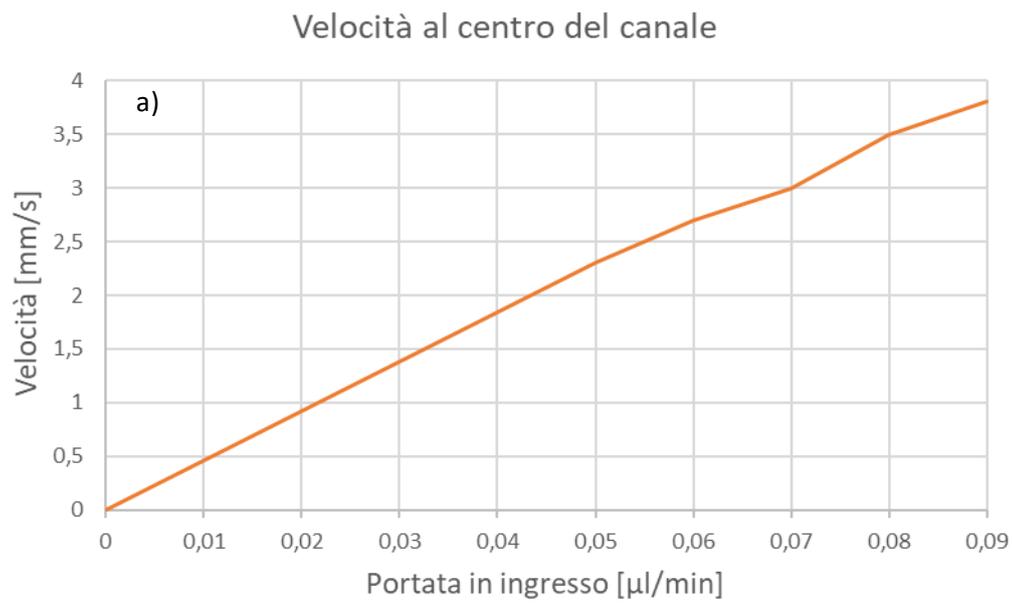


Figura 18: a) il grafico che mostra l'andamento della velocità (al centro del canale) al variare della portata in ingresso; b) si mostra la distribuzione della velocità sui piani trasversali (input 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$).

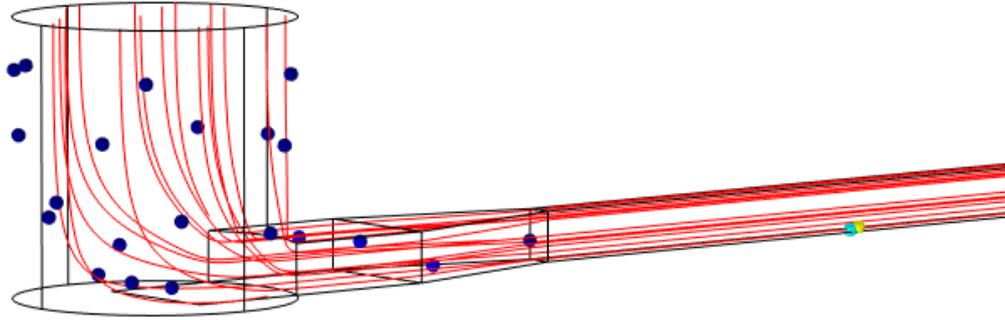


Figura 19: si mostrano le linee di flusso delle particelle

Il chip microfluidico studiato da *Landwehr et al* ^[32] permette di studiare le risposte biofisiche delle singole cellule grazie alle “micro-trappole” sparse lungo il condotto principale (ognuna in grado di ospitare una sola cellula); inoltre vi sono due ingressi differenti per il medium messo in moto da una pompa peristaltica (indicato dalla freccia rossa in alto in *Fig.16*) e per le cellule in soluzione: questa differenziazione permette di inserire le cellule quando il moto del fluido risulta essere a regime. L’altezza del canale è trascurabile rispetto alle altre dimensioni, si studia quindi la distribuzione di shear stress e velocità sul piano basale del condotto: la presenza di trappole è un vantaggio, ma ciò rende le due distribuzioni poco omogenee nell’intorno delle trappole (vedi *Fig.21* e *Fig.22*). Il tracciamento particellare rivela che solo una piccola percentuale delle cellule in circolo risulta essere intrappolata e quindi oggetto di analisi (*Fig.23*).

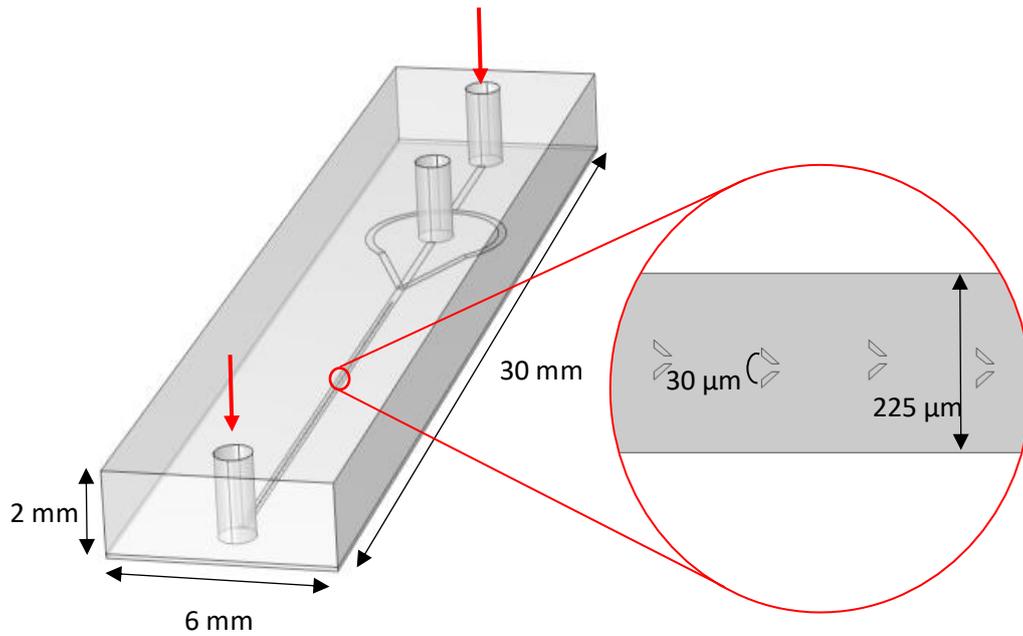


Figura 20: si mostra riproduzione su Comsol del chip microfluidico studiato da Landwer et al. ^[32], le due frecce rosse rappresentano l'input (in alto) e l'output (in basso) della pompa peristaltica.

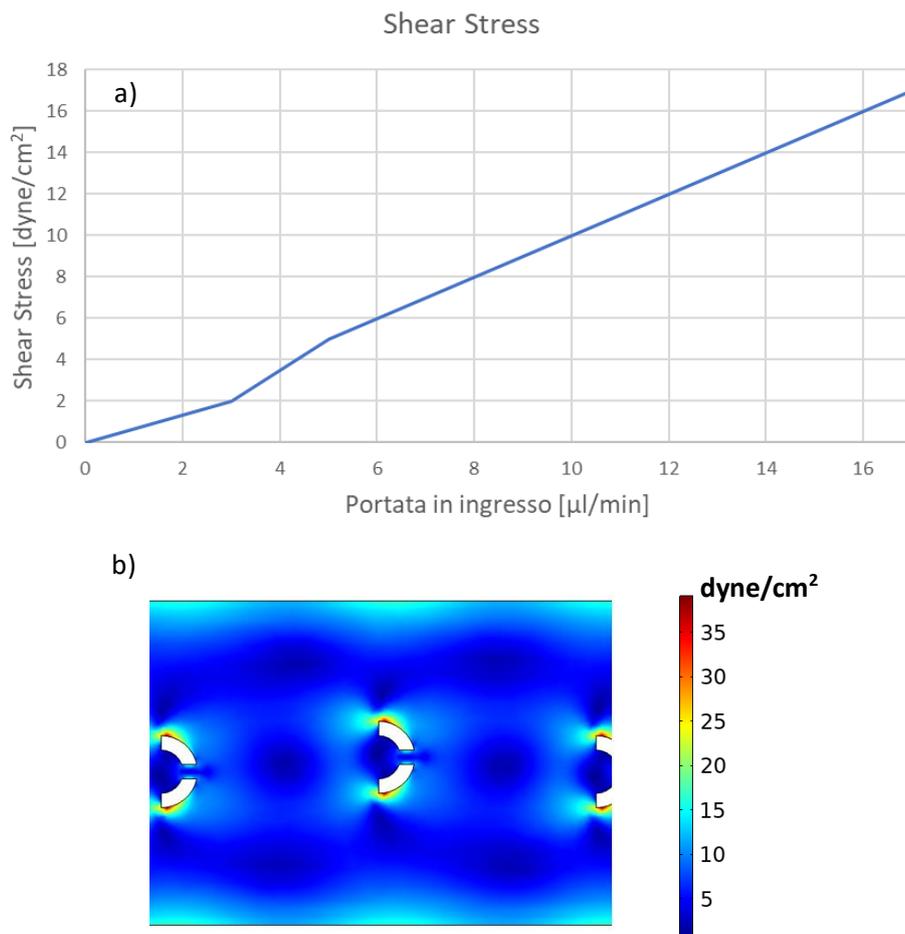


Figura 21: a) si mostra l'andamento del FSS sulla cellula all'interno della trappola; b) la distribuzione del FSS sul piano basale (input 5 μl/min)

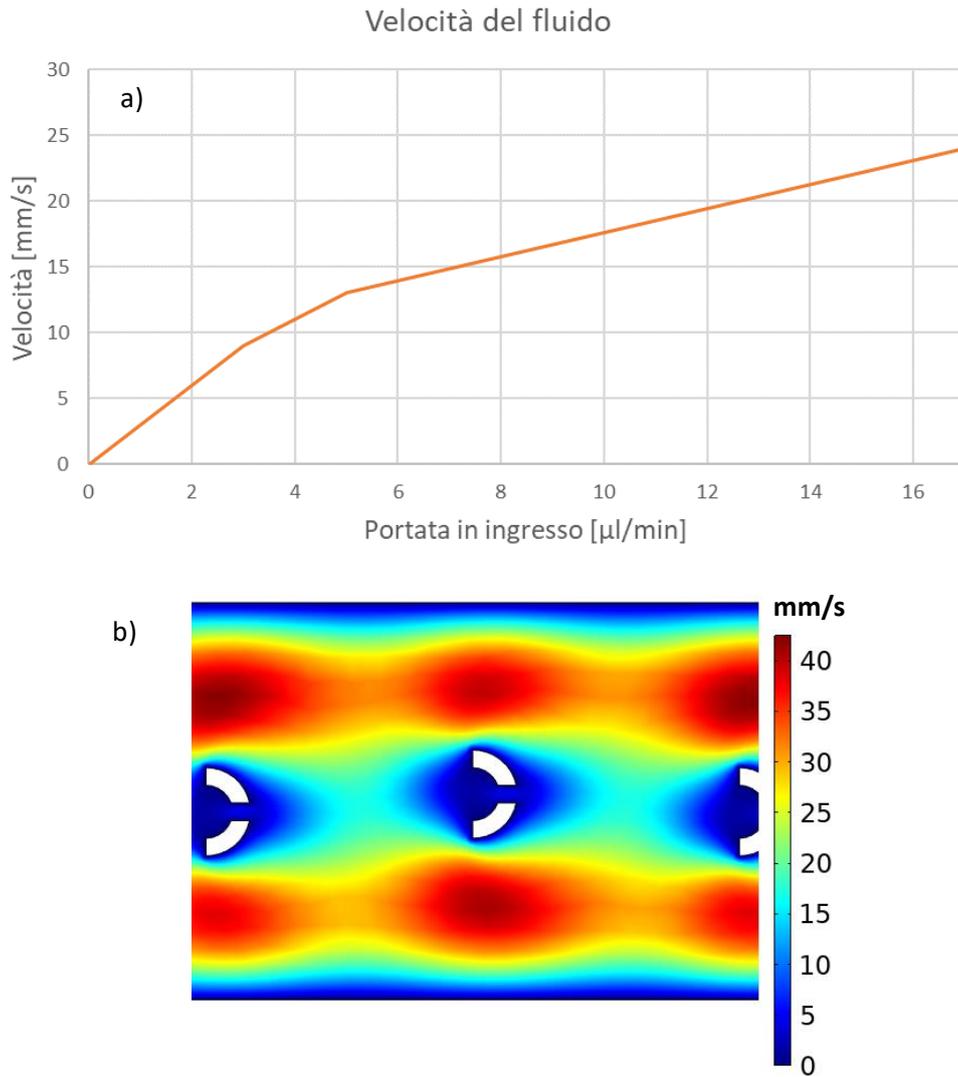


Figura 22: a) il grafico che mostra l'andamento della velocità del fluido sull'intorno di una cellula; b) si mostra la distribuzione della velocità sul piano basale (input $2 \mu\text{l}/\text{min}$).

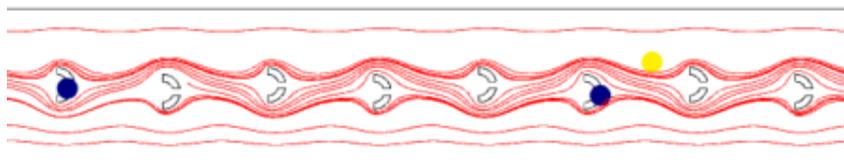


Figura 23: si mostrano le linee di flusso delle particelle in moto

Si riproduce infine una versione modificata del device multicanale di *Marrella e Fedi* ^[34] (Fig.24). Questo tipo di dispositivo permette di sviluppare diversi livelli di shear stress, mantenendo invariati la portata in ingresso e le dimensioni dei canali, andando a variare il numero di questi ultimi (vedi *Cap. 1.4.1*). Un approccio di questo tipo riduce notevolmente i tempi di sperimentazione, riuscendo a riprodurre tre differenti livelli di FSS simultaneamente e utilizzando un'unica pompa peristaltica.

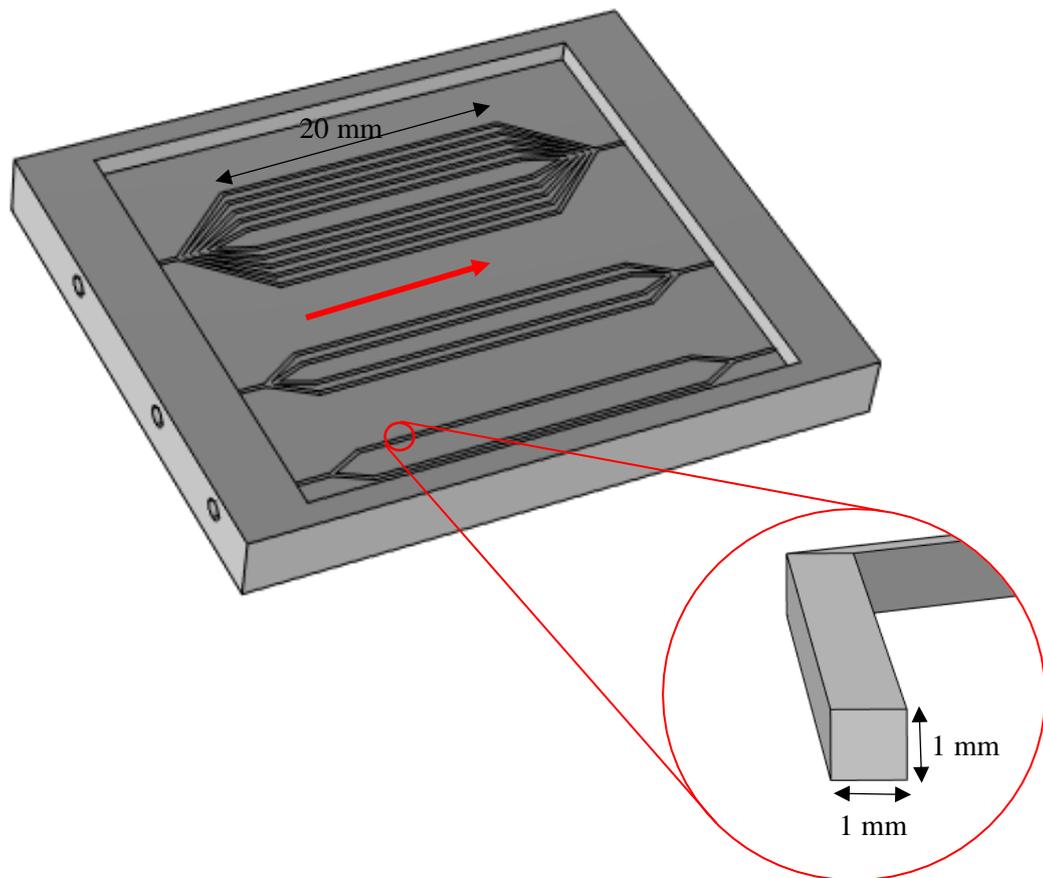


Figura 24: si mostra la geometria del device microfluidico modificato di Marrella e Fedi ^[34]; in rosso la direzione del flusso

Nella riproduzione qui mostrata si è variato il numero di canali di ogni set (2/4/10) rispetto al paper di riferimento e si imposta una portata in ingresso comune $Q^{in} = 22.5 \text{ ml/min}$. Si è utilizzata la formula:

$$\frac{Q^{in}}{n} = \frac{\tau B H^2}{6\mu} \quad (3)$$

in cui si sono fissati $B = H = 1 \text{ mm}$, $\mu = 10^{-6} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (valore di viscosità dell'acqua), $\tau = 2/5/10 \text{ dyne/cm}^2$, ricavando così i valori ideali per n e Q^{in} . I valori di WSS sui tre canali risultano essere circa quelli desiderati ($2/5/20 \text{ dyne/cm}^2$). Osservando tuttavia i risultati delle simulazioni sul set da dieci canali, si nota che non vi è uniformità tra di essi per ciò che riguarda i livelli di FSS e di velocità, poiché quelli centrali presentano valori più elevati rispetto a quelli laterali (*Fig. 25 e Fig. 26*). Osservando inoltre i risultati di tracciamento particellare, sempre sul set di dieci canali, si nota come le particelle non si dividano in modo perfettamente omogeneo sui condotti (*Fig.27*).

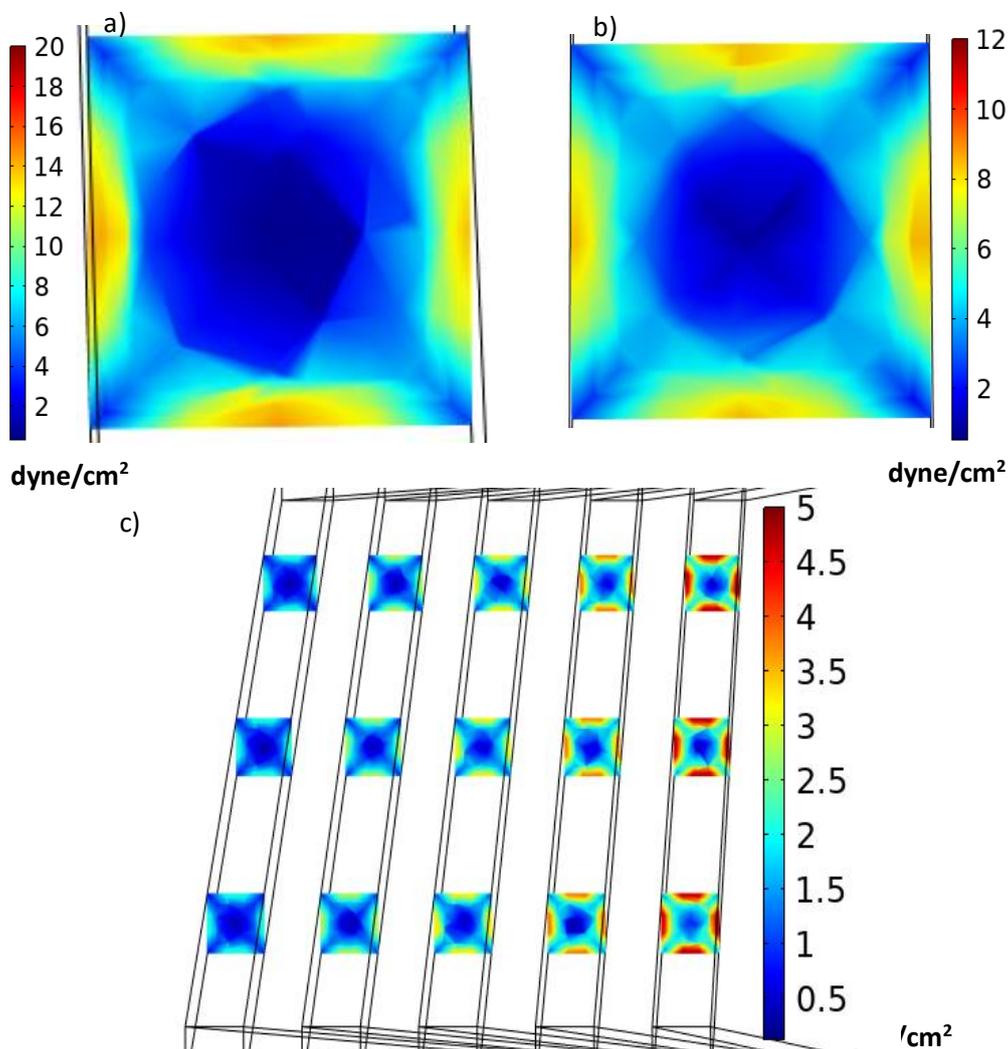


Figura 25: si mostra la distribuzione del FSS sul set da 2 canali (a), 4 canali (b) e 10 canali (c). Per semplificazione grafica si mostrano solo alcuni dei piani di distribuzione.

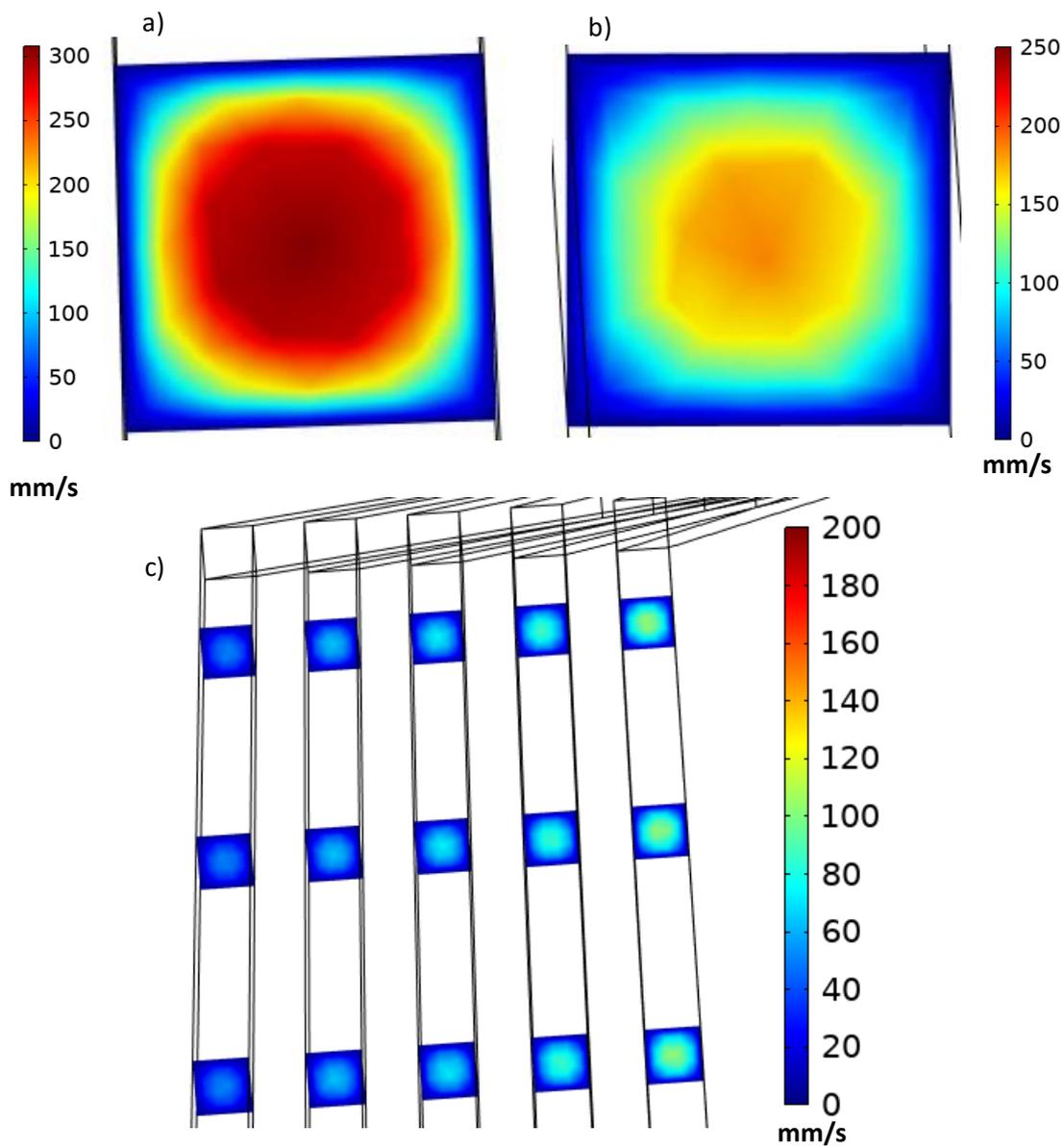


Figura 26: si mostra la distribuzione della velocità sul set da 2 canali (a), 4 canali (b) e 10 canali (c). Per semplificazione grafica si mostrano solo alcuni dei piani di distribuzione.

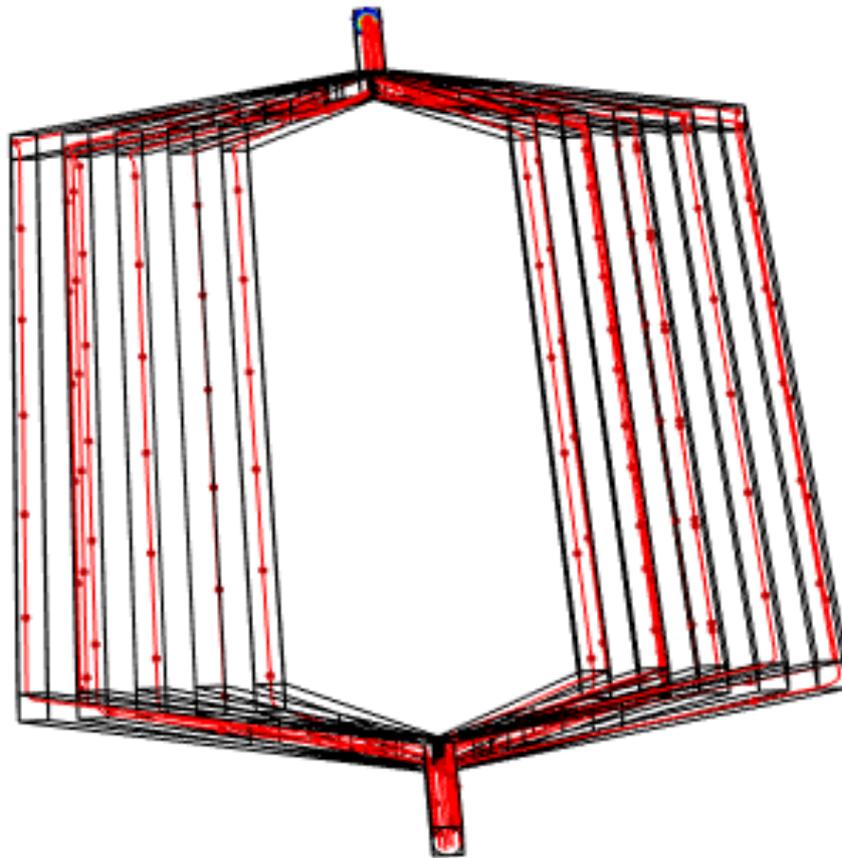


Figura 27: si mostrano le linee di flusso delle particelle all'interno del set da 10 canali.

3.2 Organs-On-Chip (simulazioni)

Gli OOC, come spiegato nel *Cap. 1.4.2*, sono sempre più considerati come una tecnologia potenzialmente dirompente in ambito medico e capace di risolvere problemi come insuccesso nei trial clinici, elevato costo di nuovi farmaci, assenza di trattamenti sufficientemente efficaci per alcune malattie e questioni etiche sollevate legate alla sperimentazione animale. Il focus principale di questi dispositivi risulta tuttavia essere principalmente di tipo chimico e biologico. Si sono quindi svolte simulazioni sugli OOC di riferimento in ambito farmaceutico (vedi *Cap. 1.4.2*), per valutarne i parametri fisici.

Si è riprodotta la geometria del device fabbricato dall'azienda *TissUse*. Per semplicità computazionale si è riprodotto solo uno dei due set di canali/pozzetti e si sono utilizzati ai fini delle simulazioni solamente un *Inlet* ed un *Outlet*, non rappresentando il terzo foro che ha una funzione strettamente di controllo. Il flusso è monodirezionale e segue la direzione indicata dalla freccia in rosso (*Fig. 28*).

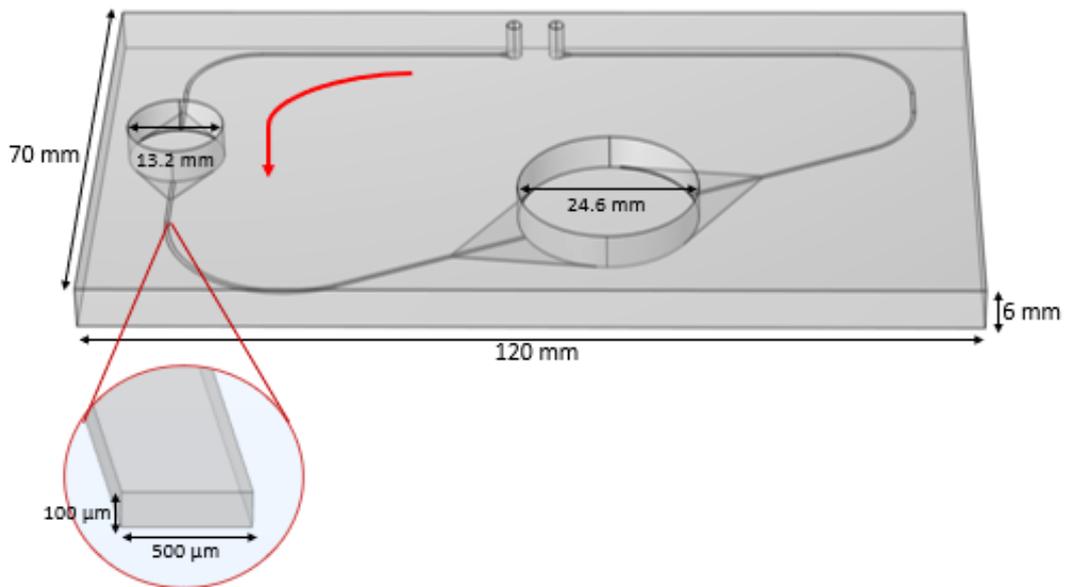


Figura 28: si mostra la geometria sviluppata su Comsol del OOC prodotto da TissUse.

Sono riportati in seguito i risultati delle simulazioni (*Fig. 29, Fig.30, Fig. 30*). Si sono trovati empiricamente i valori di portata in ingresso per ottenere i livelli di WSS biologici. Come si può notare tuttavia, questi livelli sono presenti solo nei canali, mentre nei due pozzetti questi si abbassano notevolmente. Questo perché le dimensioni dei canali e dei pozzetti risultano essere molto differenti, rendendo molto difficile l'omogeneità del FSS su tutto il dispositivo. La velocità (*Fig. 30*), sempre riferita ai canali che collegano i pozzetti, risulta avere un andamento lineare in relazione alla portata in ingresso, variando da valori presenti nei capillari (5 mm/s) a valori più vicini a quelli presenti nelle grandi vene (70 mm/s). Il flusso delle particelle risulta essere omogeneo sui canali, mentre all'interno dei pozzetti di coltura subisce variazioni considerevoli di traiettoria (*Fig. 31*).

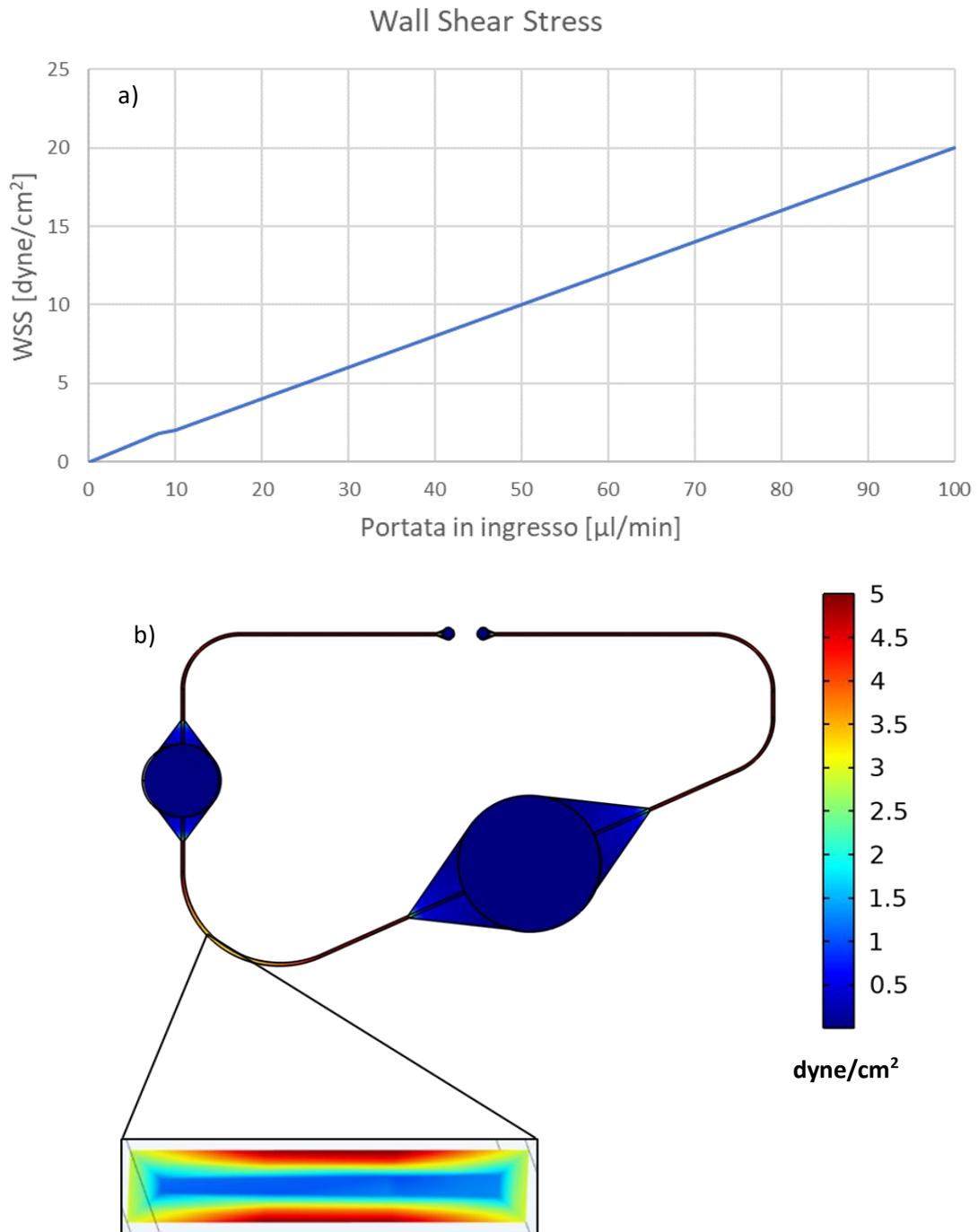


Figura 29: a) il grafico che mostra la variazione del WSS; b) la distribuzione dello shear stress con una portata (input 25 $\mu\text{l}/\text{min}$).

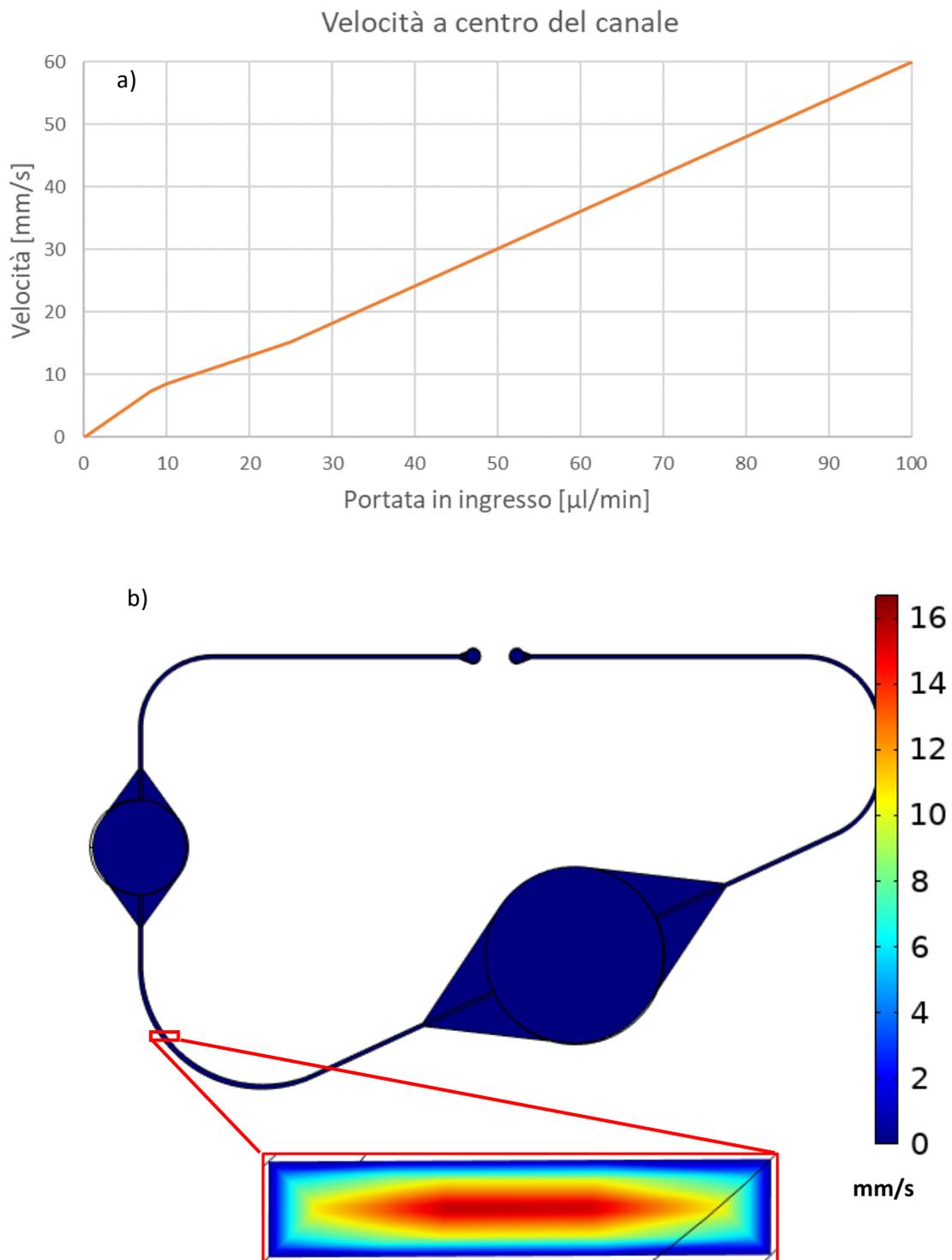


Figura 30: a) il grafico che mostra la variazione del FSS nel device di TissUse; b) la sua distribuzione (input $25 \mu\text{l}/\text{min}$).

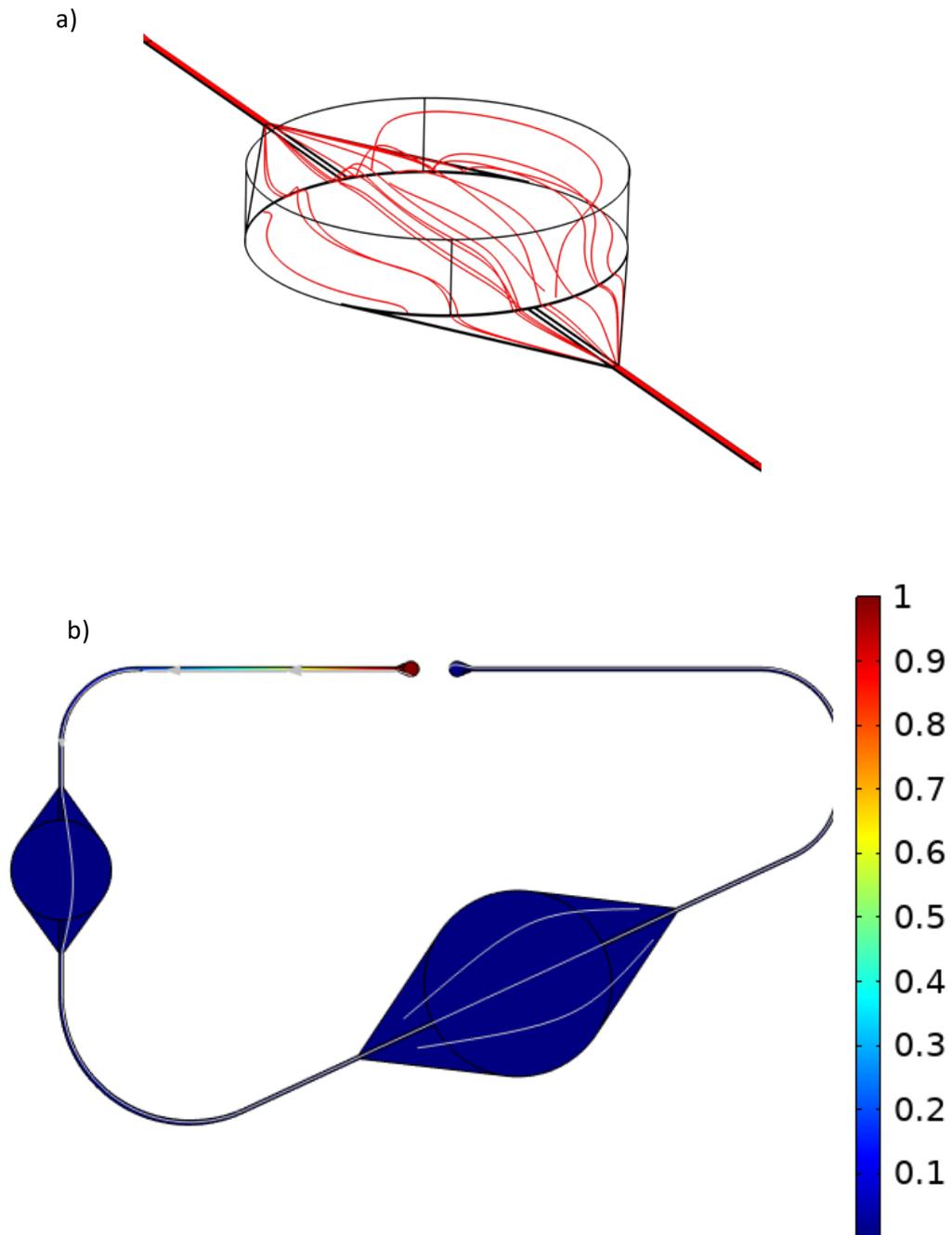


Figura 31: a) si mostra la deviazione delle linee di flusso felle particelle all'interno dei pozzetti; b) si mostra la diffusione di un farmaco generico (concentrazione 1M) in condizioni statiche dopo 96 h dalla somministrazione.

Successivamente si è sviluppata su *Comsol Multiphysics* la geometria del chip prodotto da *AimBiotech* (Fig. 32).

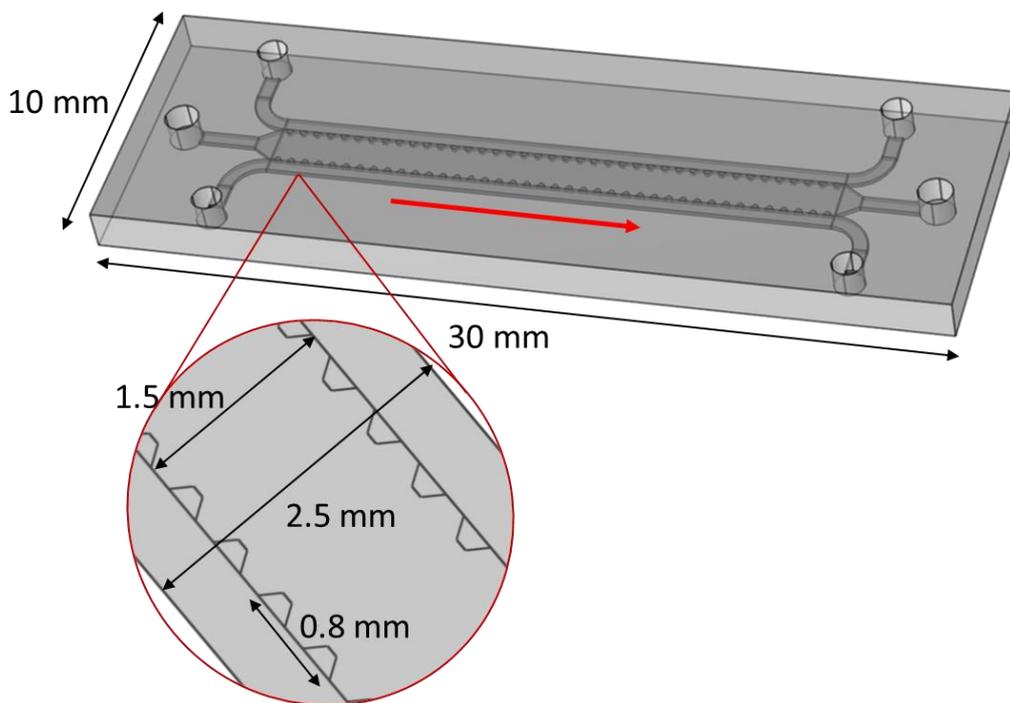


Figura 32: si mostra la rappresentazione su Comsol Multiphysics del chip prodotto da AimBiotech; indicata in rosso la direzione del flusso.

Questo OOC viene utilizzato principalmente in condizioni statiche, per studiare il fenomeno di intravasazione delle cellule tumorali nei vasi sanguigni (vedi *Cap. 1.4.2.2*) e presenta due canali laterali, nei quali si mettono in soluzione rispettivamente cellule tumorali ed epiteliali, ed un canale centrale nel quale si pone un hydrogel, con lo scopo di mimare le funzioni della matrice extracellulare. Si svolge una parte delle simulazioni in condizioni dinamiche, in cui si mette in circolo il medium cellulare dei due canali laterali (supponendo di collegare i fori di ingresso e uscita ad una pompa peristaltica) ed una parte in condizioni statiche, in cui si studia la diffusione di un farmaco generico in concentrazione 1 mol/m^3 . Per motivi di semplificazione computazionale si è ipotizzata la stessa portata in ingresso su entrambi gli *Inlet* dei due canali laterali (distribuzione del FSS simmetrica) tuttavia si possono imprimere condizioni separate per ogni condotto. I risultati mostrano una certa uniformità nella distribuzione del FSS soprattutto nei canali laterali e sul rispettivo piano basale (*Fig.33*). In prossimità degli ostacoli tra il canale laterale e quello centrale vi è un innalzamento del valore di SS.

Andando a valutare la distribuzione di velocità, questa risulta essere nulla nel condotto centrale, dovuta alla presenza dell'hydrogel (*Fig. 34*). Valutando invece il tracciamento particellare (*Fig. 35*), si scopre che se messe in circolo, le cellule raramente attraversano l'hydrogel per intravasare nell'altro canale: un possibile utilizzo di questo OOC potrebbe essere mettere in circolo in un primo momento le cellule tumorali, per poi studiare in condizioni statiche la capacità di intravasazione di queste ultime a seguito della stimolazione del FSS. Si nota invece come la diffusione del farmaco risulti essere omogenea su tutto il dispositivo ($t= 12$ h), riuscendo penetrare nell'hydrogel e nel canale opposto a quello di iniezione. (*Fig. 36*).

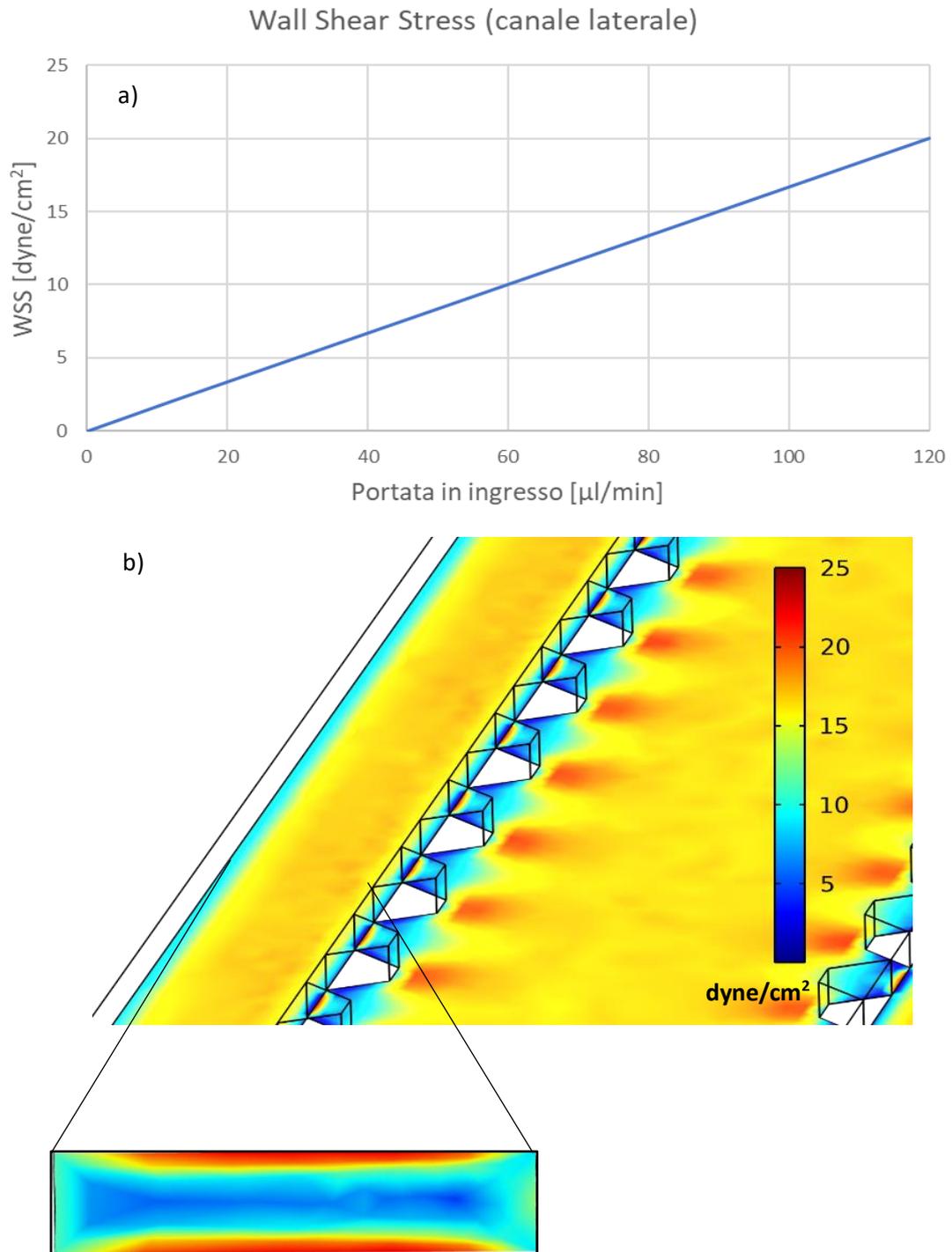


Figura 33: a) il grafico che mostra la variazione del WSS nei canali laterali; b) la distribuzione del FSS sul piano basale e trasversale del canale con una portata in ingresso pari a 120 μ l/min.

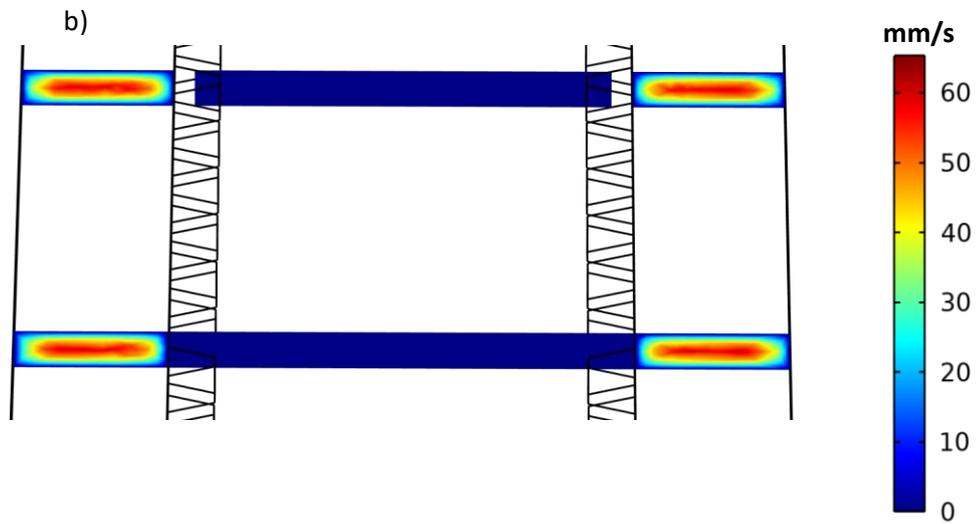
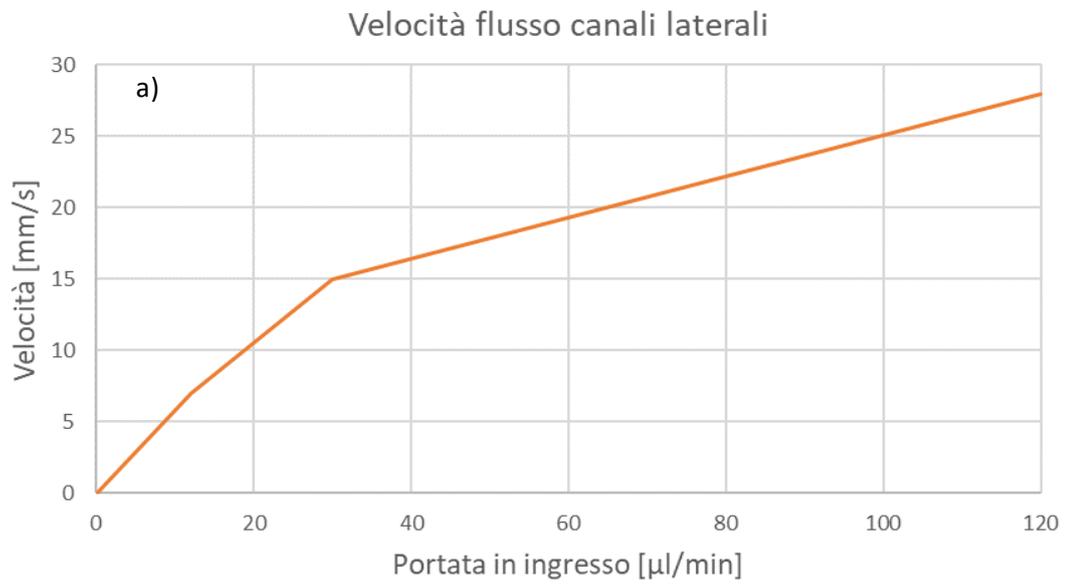


Figura 34: a) il grafico che mostra l'andamento della velocità di flusso nei canali laterali; b) la distribuzione del FSS sui canali.

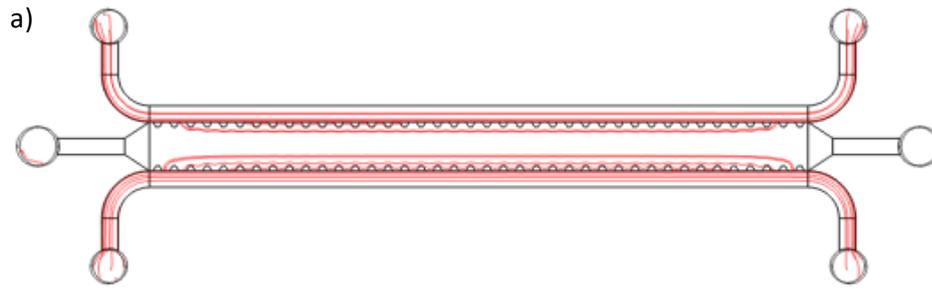


Figura 35: linee di flusso delle particelle in moto

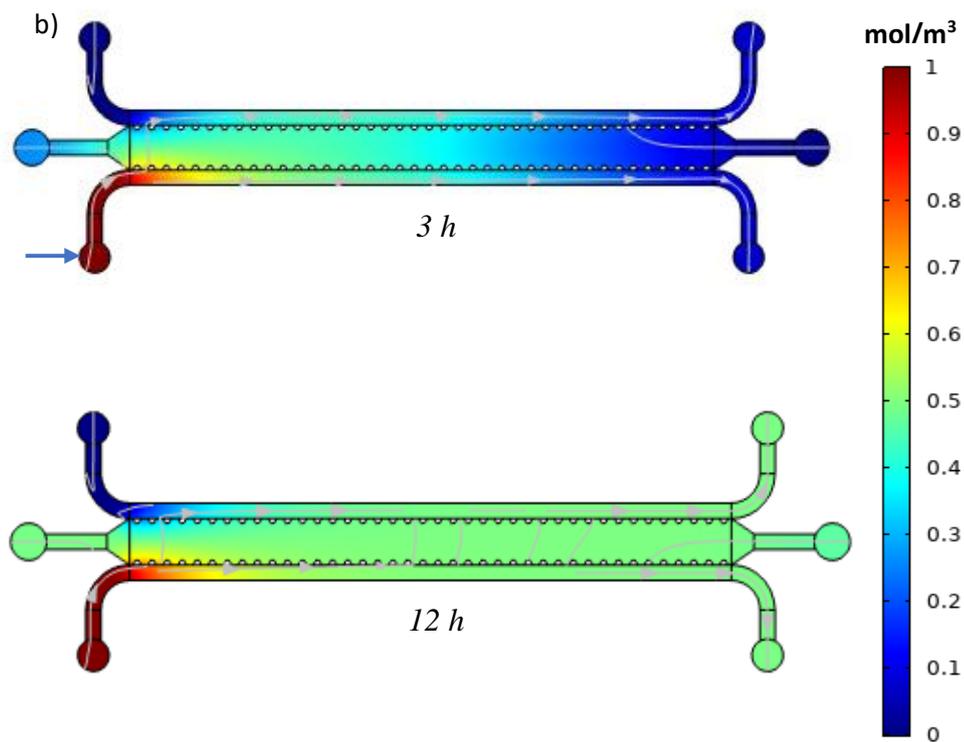


Figura 36: a) linee di flusso delle particelle in moto; b) si mostra la diffusione di un farmaco generico nel caso statico al tempo $t=3 h$ e $t=12 h$ (la freccia blu indica il sito di iniezione).

Si riproduce infine la geometria del chip prodotto dall'azienda *Emulate* (Fig. 37).

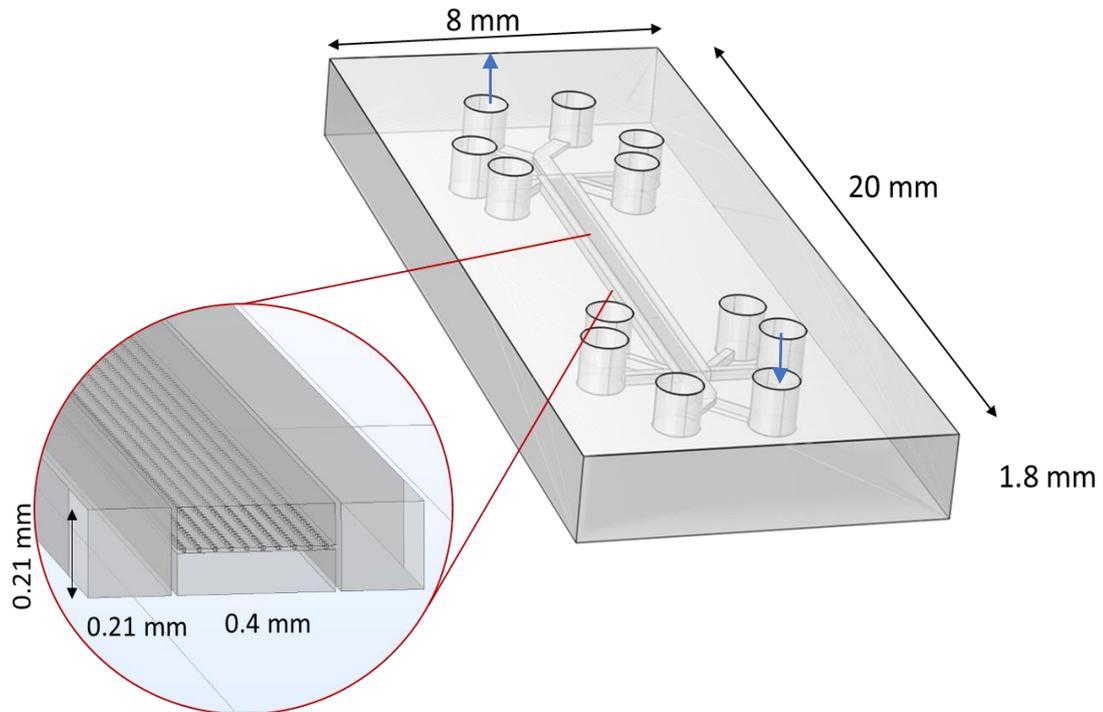


Figura 37: rappresentazione su Comsol del chip prodotto da Emulate.

Il device viene utilizzato creando il vuoto nei due condotti laterali e attraverso due pompe si fanno dilatare e contrarre questi ultimi, causando una deformazione oscillatoria delle pareti del canale centrale, ricreando così il processo di respirazione (vedi *Cap. 1.4.2.3*). Nelle simulazioni svolte, per semplificazione computazionale si è scelto di effettuare l'analisi su uno dei due canali centrali (in cui scorre il medium cellulare), ai capi dei quali si collega una pompa peristaltica (*Inlet* e *Outlet* contrassegnati con frecce blu). Nella *Figure* si mostrano i risultati ottenuti nelle simulazioni. Si sono trovati empiricamente i valori di portata in ingresso per ottenere i livelli di WSS di riferimento e tracciarne quindi l'andamento (Fig.38). Avendo il canale una forma rettangolare, il WSS risulta più elevato sui lati maggiori della sezione. La velocità, valutata al centro del condotto, risulta avere anche in questo caso un andamento lineare al variare della portata in

ingresso (Fig. 39). Le linee di flusso delle particelle invece risultano avere una distribuzione omogenea lungo tutto il device (Fig. 40).

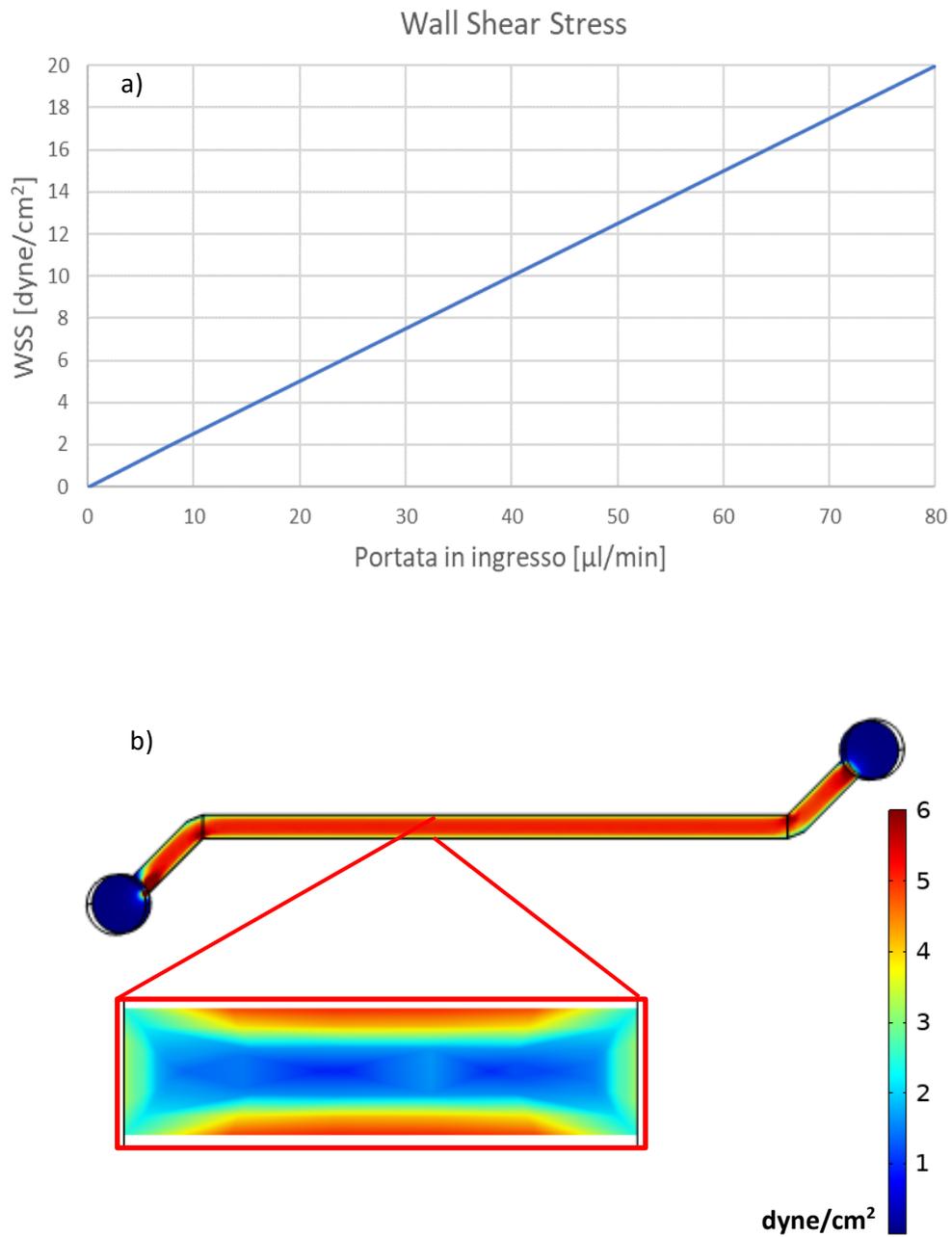


Figura 38: a) il grafico che mostra l'andamento del WSS; b) la sua distribuzione sul piano basale del canale, con ingrandimento sul piano trasversale (input $20 \mu\text{l}/\text{min}$).

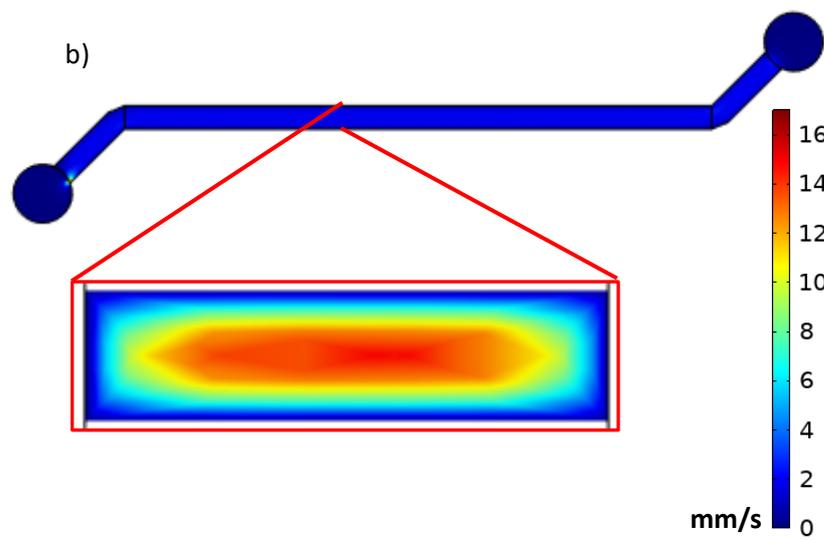
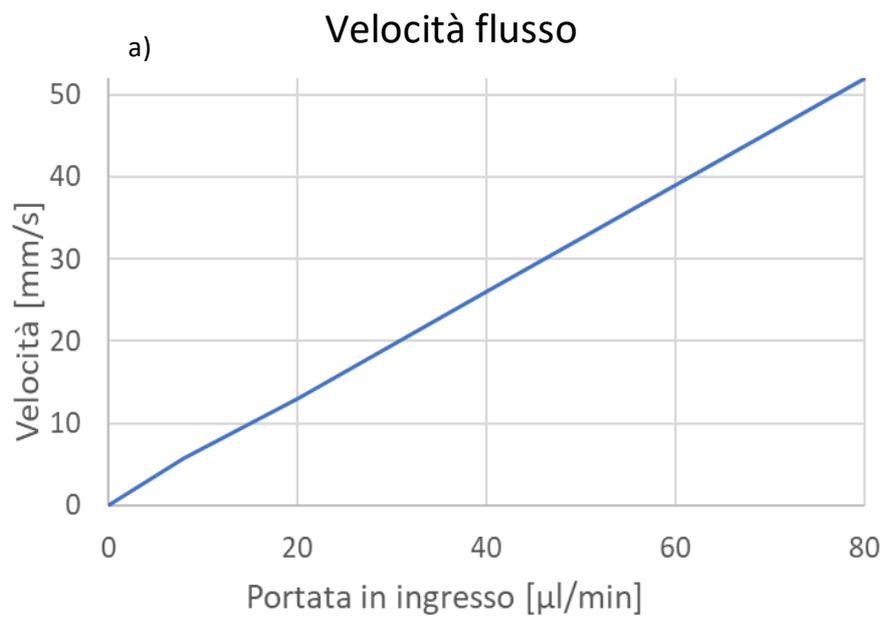


Figura 39: a) il grafico che mostra l'andamento della velocità di flusso nel canale centrale; b) la sua distribuzione sul piano basale del canale, con ingrandimento sulla sezione trasversale.

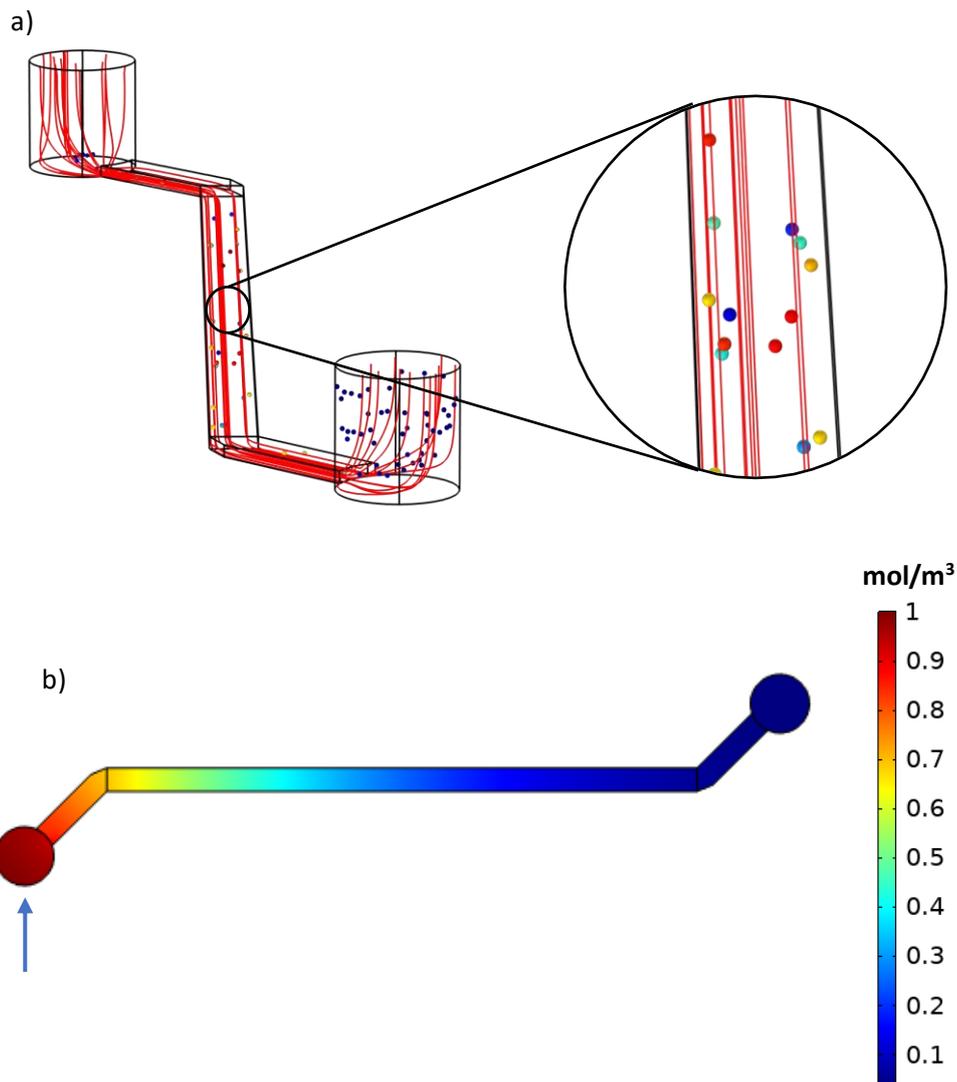


Figura 40: a) si mostrano le traiettorie delle particelle in moto nel canale; b) si mostra la diffusione di un farmaco generico (concentrazione 1M) dopo 6 h dalla somministrazione (freccia blu).

Tutti gli OOC analizzati in questo capitolo, sono stati in grado di fornire risultati attendibili e potenzialmente utili dal punto di vista fisico, riuscendo quindi a porre l'attenzione su un aspetto importante ma meno conosciuto come lo shear stress. Questi sistemi microfisiologici, tuttavia, sono predisposti dal punto di vista della progettazione, ad un'analisi chimica e biologica dei fenomeni. Essendo infatti il design studiato in modo permettere un'interazione biologica delle cellule e più in generale delle colture, consente da una parte di riprodurre una complessità e completezza maggiore dei fenomeni, dall'altra mette in evidenza un deficit di

simulazione dello shear stress, parametro importante nel processo di valutazione dell'evoluzione delle metastasi. I dispositivi microfluidici, molto più semplici rispetto agli OOC, per l'alta peculiarità di utilizzo, permettono tuttavia sotto questo punto di vista, un'analisi più chiara ed attendibile.

Nel capitolo successivo si mostra quindi lo sviluppo di un device microfluidico specifico per analisi fluidodinamiche, in particolare dello shear stress.

3.3 Sviluppo device

Dopo la ricerca e l'analisi delle varie caratteristiche di dispositivi microfluidici in letteratura, si sono trovati elementi di forza e altri di svantaggio per ognuno. Si sono quindi estrapolati i vantaggi dei devices esaminati e si cerca ora di combinarli in un nuovo prototipo microfluidico.

Tutti i sistemi analizzati utilizzano una pompa peristaltica come propulsore del moto fluidodinamico: grazie alla loro semplicità di utilizzo e di collegamento al device, si sceglie questo tipo di "motore" anche per il dispositivo in questione.

Successivamente si procede con il metodo di fabbricazione, scegliendo di optare sulla stampa 3D in quanto semplice, a basso costo ed infine controllabile e compatibile con i software di sviluppo e simulazione commerciali (come *Comsol Multiphysics*). Le stampanti 3D inoltre permettono di utilizzare il PDMS come materiale di stampa, assai versatile e semplice da usare, oltre ad essere inerte chimicamente ed elettricamente.

Si deve quindi scegliere il tipo di geometria del canale: poiché si vogliono riprodurre i processi fluidodinamici dei vasi sanguigni, si sono messi in confronto dal punto di vista fisico condotti a sezione circolare, anatomicamente più fedeli ma molto difficili da realizzare su scala microscopica tramite la stampa 3D, e a sezione quadrata, molto più compatibile e semplice dal punto di vista della realizzazione. Si sono riprodotti quindi due canali di uguale lunghezza, con sezioni quadrata e circolare, le cui misure sono state scelte affinché la loro superficie sia circa uguale (le misure corrispondono a quelle di una piccola arteria, *Fig.41*).

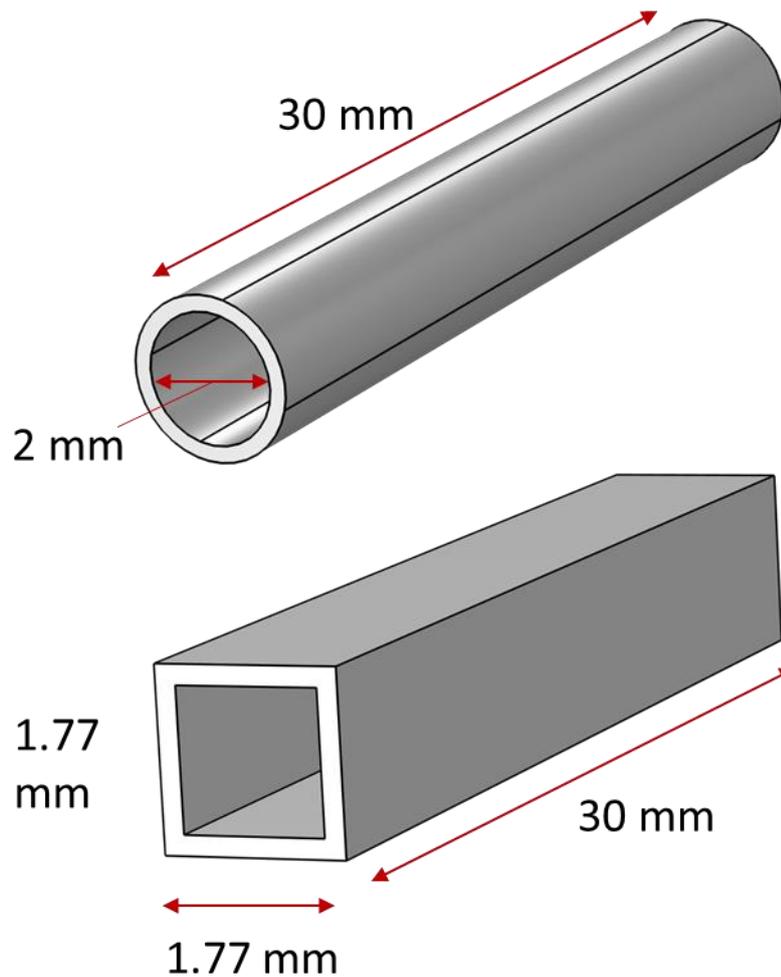


Figura 41: si mostrano le dimensioni dei due tipi di canale messi a confronto.

Si sono quindi svolte simulazioni sullo shear stress, confrontando le distribuzioni sulle sezioni trasversali dei canali, sia la loro variazione a diversi input. Come si può vedere in *Fig.42*, le due distribuzioni risultano essere simili seppur di geometria diversa, avendo entrambi una zona esterna omogenea in cui vi è un valore più alto di FSS rispetto al centro. La variazione in funzione della portata in ingresso risulta essere in entrambi i casi lineare, pressoché coincidente fino ai 30 ml/min, per poi separarsi leggermente e in maniera progressiva (*Fig.42*).

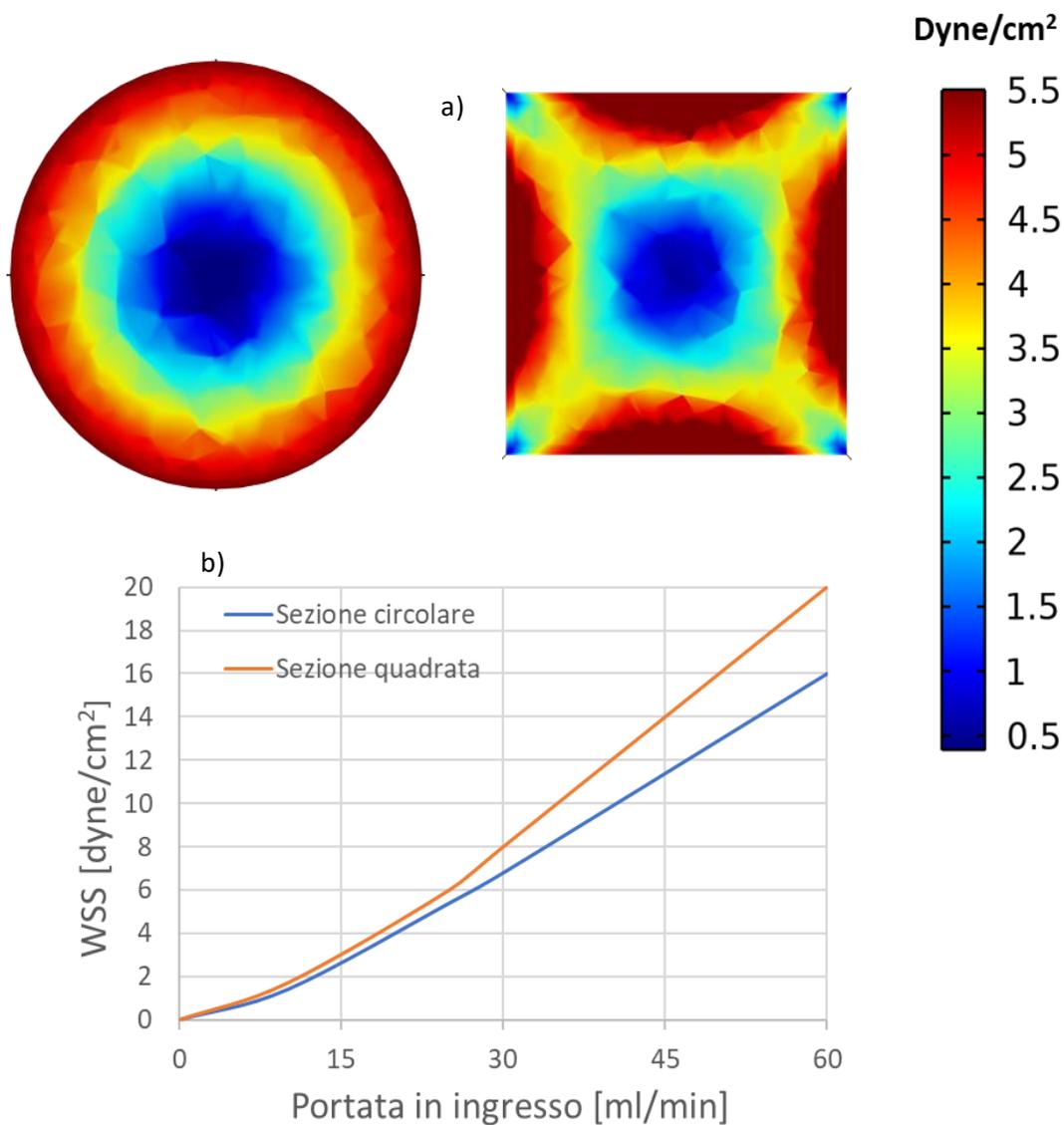


Figura 42: a) si mostra la distribuzione del FSS nei due tipi di sezione; b) il grafico confronta l'andamento del WSS in relazione alla portata in ingresso.

Dal punto di vista della geometria invece, si è deciso di utilizzare le caratteristiche del device sviluppato da Marrella e Fedi ^[34], per poter ottenere simultaneamente tre livelli di FSS, utilizzando un unico valore di portata in ingresso, usando quindi un'unica pompa peristaltica. Partendo dall'equazione (3) si sceglie di mantenere il numero dei canali $n = 1$, in modo da evitare la differenziazione dei valori di SS all'interno dello stesso set i canali (vedi Cap. 3.1).

$$(1) \quad \tau = \frac{6\mu Q^{in}}{BH^3} \xrightarrow{B=H} B^3 = \frac{6\mu Q^{in}}{\tau}$$

Scegliendo arbitrariamente il valore di portata in ingresso $Q^{in} = 15 \text{ ml/min}$ e imponendo i valori di SS di riferimento $\tau_{1,2,3} = 2/5/20 \text{ dyne/cm}^2$, si ottengono le dimensioni della sezione dei tre canali (in rosso i valori teorici, in nero quelli arrotondati e corretti ai fini delle simulazioni):

$$B_1 = 1.88 \text{ mm} \rightarrow 2 \text{ mm};$$

$$B_2 = 1.38 \text{ mm} \rightarrow 1.6 \text{ mm};$$

$$B_3 = 0.87 \text{ mm} \rightarrow 1 \text{ mm};$$

I risultati delle simulazioni mostrano come il FSS abbia lo stesso tipo di distribuzione sui tre canali, con i valori di WSS molto vicini a quelli desiderati (*Fig.44*). Le particelle in moto all'interno dei canali, non avendo questi ramificazioni, presentano traiettorie più lineari ed omogenee (*Fig. 43*).

In conclusione, si pensa che un device microfluidico con questo nuovo tipo di geometria, possa essere interessante ed affidabile per l'analisi fluidodinamica e biofisica di cellule in soluzione, in particolare per le CTCs, la loro vitalità e capacità di clusterizzazione.

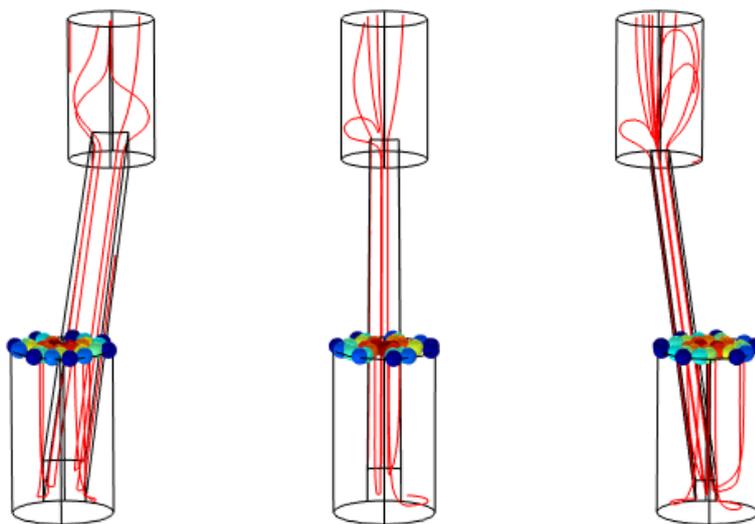


Figura 43: Linee di flusso delle particelle in soluzione.

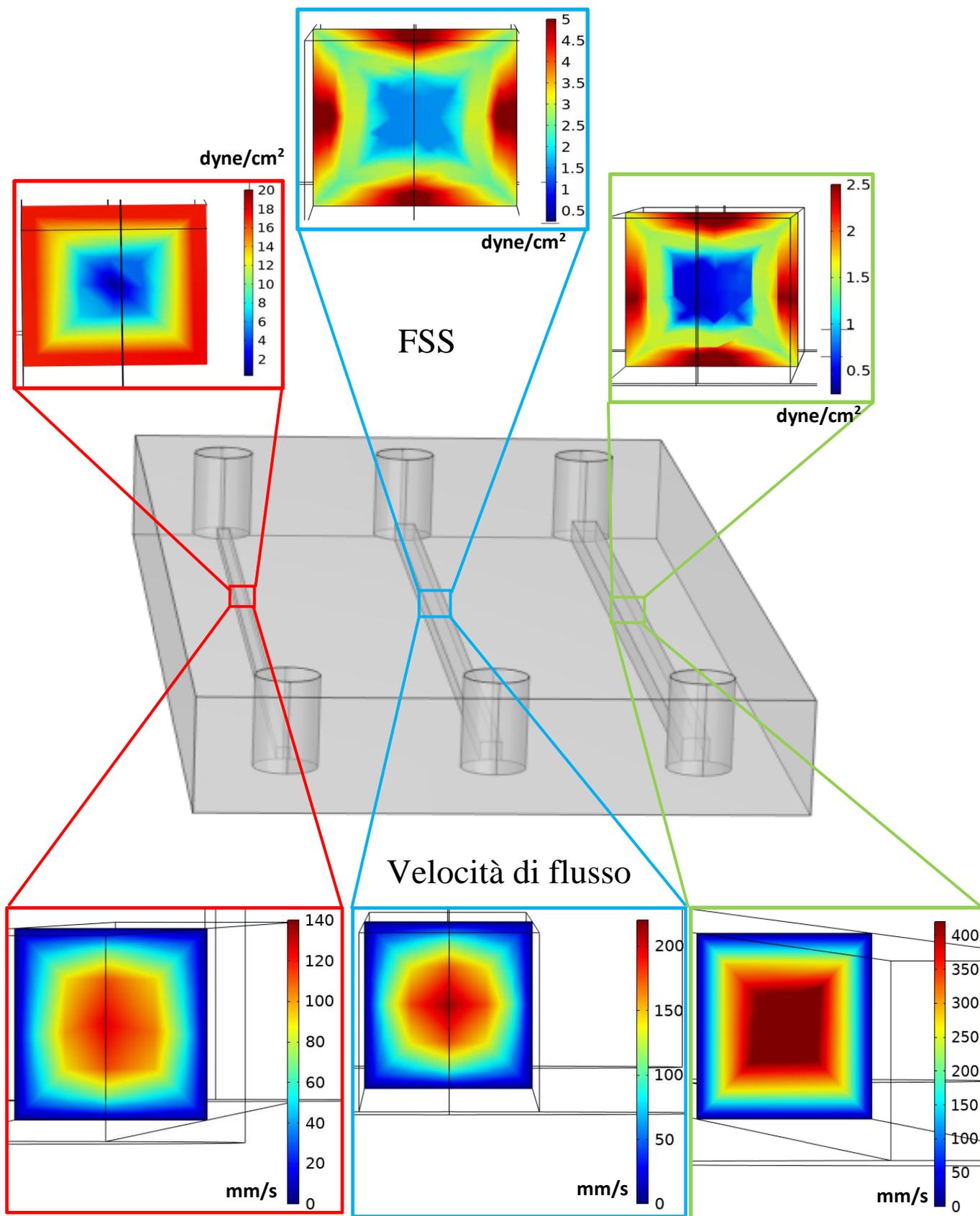


Figura 44: si mostra la distribuzione del FSS e della velocità sulla sezione trasversale dei tre canali.

4. Conclusioni

In questo lavoro di tesi si è considerato come scenario quello della proliferazione neoplastica, in particolare si sono esaminati e valutati i parametri fluidici e il loro impatto in oncologia. Il viaggio delle cellule neoplastiche (CTCs), che si staccano dal sito primario e proliferano su un organo bersaglio a distanza, è soggetto a stress chimico-fisici poco conosciuti. Tra questi si prende in considerazione lo shear stress emodinamico, quale indicatore principale di alterazione del funzionamento cellulare e quindi di grado di “malignità”. Per la valutazione di questi parametri, si è esaminato lo stato dell’arte attuale di dispositivi in grado di ricreare i fenomeni fisiologici su scala microscopica, riproducendone le geometrie e svolgendo analisi CFD sul software *Comsol Multiphysics*.

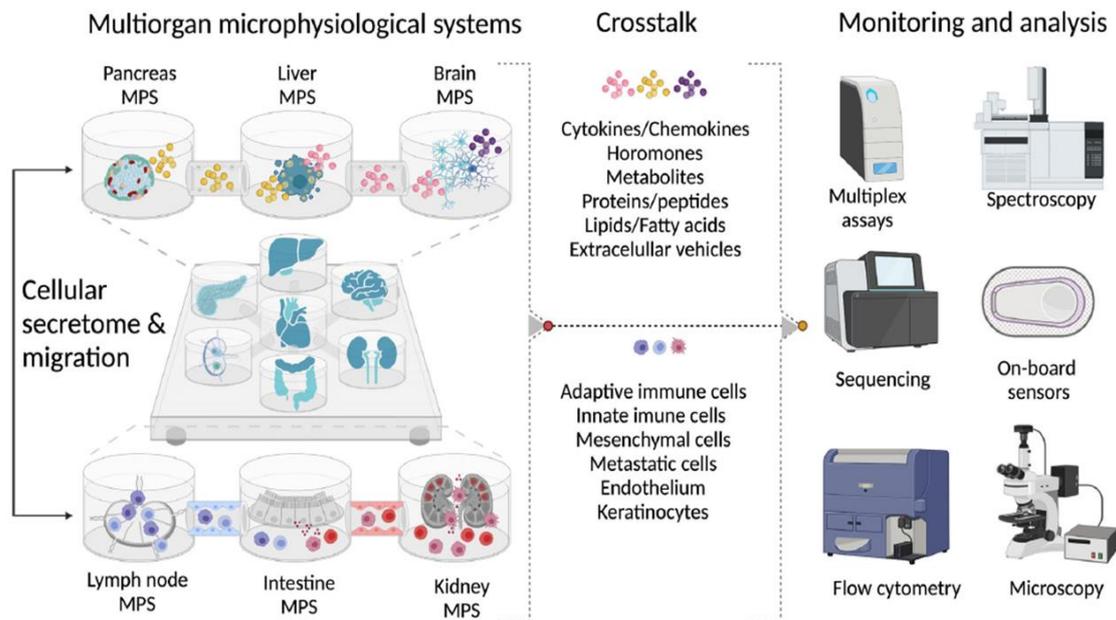


Figura 45: Rappresentazione multiorgans on chip e studi ad essa associati; fonte: Martin Trapecar, 'Multiorgan microphysiological systems as tools to interrogate interorgan crosstalk and complex diseases', 2021, Febs Press

Si è partito dai più semplici chip microfluidici, che grazie alla loro alta specificità di utilizzo sono in grado esplorare le proprietà fisiche (FSS in particolare) di fluidi su scala microscopica. Si sono successivamente esaminati i sempre più utilizzati Organs-On-Chip, sistemi microfluidici che permettono di simulare le attività biologiche, la meccanica e la risposta fisiologica di interi organi. Studiando i molteplici risultati biologici presenti in letteratura, si deduce come il grado di complessità della rappresentazione biologica degli OOC permetta di avere una visione più ad alto livello, mettendo però in evidenza un deficit di simulazione del FSS. Un possibile approccio per colmare questa lacuna potrebbe essere modificare questi OOC per meglio predisporli ad un tipo di analisi biofisico piuttosto che chimico. Sfruttando invece la scalabilità di questi sistemi, ovvero la capacità di poter interconnettere più OOC, si è scelto di mettere a punto un nuovo device microfluidico, che combina molti dei vantaggi dei devices studiati precedentemente. La possibilità di integrare ed interconnettere diversi dispositivi (approccio “Multiorgan-On-Chip”, *Fig.45*), ognuno adatto ad un tipo di analisi e studio, permette da una parte di ottenere un elevato grado di complessità e comprensione dei fenomeni biologici e della loro influenza reciproca, dall'altra di non perdere la capacità di isolamento dei parametri di interesse di dispositivi più semplici ma specifici negli studi cellulari. Con questo tipo di ottica si possono superare i modelli in vitro/animali tradizionali o le semplici colture cellulari, riuscendo ad avere più successo nei trial clinici farmacologici, più trattamenti sufficientemente efficaci per alcune malattie su cui si sa ancora poco e magari un giorno superare lo step della sperimentazione animale, oggetto spesso di dibattiti sulle questioni etiche annesse.

5. Bibliografia

- [1]. Vicki Plaks et al., “*Circulating Tumor Cells*”, in *Science* (2013);
- [2]. C. L. Chaffer et al., “*A perspective on cancer cell metastasis*” in *Science*(2011);
- [3]. Siegel RL et al., “*Cancer statistics*”, in *CA Cancer J Clin* (2016);
- [4]. Steinert G, Schoilch S, Koch M et al “*Biology and significance of circulating and disseminated tumour cells in colorectal cancer*”, in *Langenbecks Arch Surg* (2012);
- [5]. Weitz J, Koch M, Debus J et al, “*Colorectal cancer*”in *Lancet* (2005);
- [6]. Rahbari NN, Bork U, Kircher A et al, “*Compartmental differences of circulating tumor cells in colorectal cancer*”, in *Ann Surg Oncol* (2012);
- [7]. Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K et al., “*Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer*”, in *Gastroenterology* (2010);
- [8]. Bork U, Rahbari NN, Schoilch S et al., “*Circulating tumour cells and outcome in nonmetastatic colorectal cancer: a prospective study*”, in *Br J Cancer* (2015);
- [9]. Allard WJ, Matera J, Miller MC et al., “*Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases*”, in *Clin Cancer Res* (2004);
- [10]. Miller MC, Doyle GV et al., “*Significance of circulating tumor cells detected by the CellSearch system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer*”, in *J Oncol* (2010);
- [11]. Sebastián A. García et al, “*Circulating tumor cells*”, in *Methods mol Biol* (2018);
- [12]. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM et al., “*Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood*”, in *Proc Natl Acad Sci USA* (2000);
- [13]. Qiong Huang at al., “*Fluid shear stress and tumor metastasis*”, in *Am J Cancer Res* (2018);
- [14]. Galbraith CG et al., “*Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton*”, in *Cell Motil Cytoskeleton* (1998);

- [15]. Haddad O et al., “*Tumor cell/endothelial cell tight contact upregulates endothelial adhesion molecule expression mediated by NFkappaB: differential role of the shear stress*” in *Exp Cell Res* (2010);
- [16]. Swartz MA and Lund AW, “*Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity*”, in *Nat Rev Cancer* (2012);
- [17]. Massague J and Obenauf AC, “*Metastatic colonization by circulating tumour cells*”, in *Nature* (2016);
- [18]. Gray KM and Stroka KM, “*Vascular endothelial cell mechanosensing: new insights gained from biomimetic microfluidic models*”, in *Semin Cell Dev Biol* (2017);
- [19]. Rana K, Liesveld JL and King MR, “*Delivery of apoptotic signal to rolling cancer cells: a novel biomimetic technique using immobilized TRAIL and E-selectin*”, in *Biotechnol Bioeng* (2009);
- [20]. Regmi S, Fu A and Luo KQ, “*High shear stresses under exercise condition destroy circulating tumor cells in a microfluidic system*”, in *Sci Rep* (2017);
- [21]. Fu A, Ma S, Wei N, Tan BX, Tan EY and Luo KQ, “*High expression of MnSOD promotes survival of circulating breast cancer cells and increases their resistance to doxorubicin*” in *Oncotarget* (2016);
- [22]. Zhao F, Li L, Guan L, Yang H, Wu C and Liu Y, “*Roles for GP IIb/IIIa and alphavbeta3 integrins in MDA-MB-231 cell invasion and shear flow-induced cancer cell mechanotransduction*”, in *Cancer Lett* (2014);
- [23]. Qazi H, Palomino R, Shi ZD, Munn LL and Tarbell JM, “*Cancer cell glycocalyx mediates mechanotransduction and flow-regulated invasion*” in *Integr Biol* (2013);
- [24]. Taylor CA, Figueroa CA, “*Patient-specific modeling of cardiovascular mechanics*”, in *Annu Rev Biomed Eng* (2009);
- [25]. Paul D Morris, Andrew Narracott et al., “*Computational fluid dynamics modelling in cardiovascular medicine*”, in *BMJ Journals* (2015);
- [26]. Smith N, de Vecchi A, McCormick M, et al. euHeart, “*Personalized and integrated cardiac care using patient-specific cardiovascular modelling*”, in *Interface Focus* (2011);
- [27]. Gasser TC, Nchimi A, Swedenborg J, et al., “*A novel strategy to translate the biomechanical rupture risk of abdominal aortic aneurysms*”

- to their equivalent diameter risk: method and retrospective validation*”, in *Eur J Vasc Endovasc Surg* (2014);
- [28]. “Lab-on-a-chip”, <https://en.wikipedia.org/wiki/Lab-on-a-chip>, (2016);
- [29]. “Microfluidics: a general overview of microfluidics”, <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/a-general-overview-of-microfluidics/>;
- [30]. Rong Fan et al., “*Circulatory shear flow alters the viability and proliferation of circulating colon cancer cells*”, in *Scientific Reports* (2016);
- [31]. Bouskela, E., Cyrino, F. Z. & Marcelon, “*Effects of Ruscus extract on the internal diameter of arterioles and venules of the hamster cheek pouch microcirculation*”, in *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (1993);
- [32]. Landwehr et al., “*Biophysical analysis of fluid shear stress induced cellular deformation in a microfluidic device*”, in *Biomicrofluidics* (2018);
- [33]. C. E. Meacham and S. J. Morrison, “*Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity*” in *Nature* (2013);
- [34]. A. Marrella, A. Fedi et al., “*High blood flow shear stress values are associated with circulating tumor cells cluster disaggregation in a multi-channel microfluidic device*”, in *PLoS ONE* (2021);
- [35]. <https://www.tissuse.com/en/company/>;
- [36]. Hübner et al., “*Simultaneous evaluation of anti- EGFR-induced tumour and adverse skin effects in a microfluidic human 3D co-culture model*”, in *Scientific Reports* (2018);
- [37]. Liu, W., Kang, M., Qin, Y., Wei, Z. & Wang, “*Apoptosis-inducing effects of cetuximab combined with radiotherapy and hypothermia on human nasopharyngeal carcinoma CNE cells*” in *J. Clin. Exp. Med* (2015);
- [38]. Lupu et al., “*Cutaneous adverse reactions specific to epidermal growth factor receptor inhibitors*” in *J. Med.* (2015);
- [39]. Zervantonakis et al., “*Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function*”, in *Epub* (2012);
- [40]. Huh et al., “*A Human Disease Model of Drug Toxicity–Induced Pulmonary Edema in a Lung-on-a-Chip Microdevice*”, in *Sci Transl Med* (2012).

Dediche

Finalmente dopo tanta fatica sono giunto alla fine di questo percorso, fatto di soddisfazioni e amarezza, ma d'altronde questo è ciò che rende bella e variegata la vita. Il mio primo pensiero va alla mia famiglia, i miei genitori in particolare, Santa Fatima e Santo Mohamed, che nonostante le mille titubanze e attese mi hanno sempre appoggiato e spronato ad andare verso la fine, questa laurea è soprattutto vostra, grazie davvero. Ai miei fratelli, Ayoub e Yassin, a cui voglio tanto bene nonostante ce lo diciamo poco. A mio nonno Abdeslam, mancato da poco e che avrei davvero voluto fosse tra la folla a vedermi finalmente laureato, ti porterò sempre nel cuore. Ai miei amici, che mi hanno donato mille momenti di svago e leggerezza: Federico (alias "Fecchia") che mi ha sempre aperto le porte di casa sua e c'è sempre stato per me, Mattiuccio (alias "Pupo") che con la sua bontà d'animo mi ha sempre dimostrato di esserci sempre e comunque ("a l'izquierda siempre hermano"), Gianmarco (alias "Giammino") a cui voglio un sacco di bene e con i suoi venerdì sera molesti mi ha sempre fatto svagare e divertire, Ivan (alias "Charliezard" "Charlie Champagne") che nonostante la lontananza ogni volta che ci vediamo è come se non fosse passato neanche un secondo.

Infine dedico questa laurea a Najwa ("alias Nanni") che "da quando mi conosce che sto studiando", al suo supporto continuo e amore dimostrato ogni giorno, sei una flebo di felicità, grazie. Un pensiero a tutti quelli che ho dimenticato ma che mi hanno accompagnato in questa fase della mia vita.

Finalmente è finita!