

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA**

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**ORGANS ON CHIP: DISPOSITIVI
MICROFLUIDICI DESTINATI ALLA
MODELLIZZAZIONE DI MALATTIE E ALLA
SPERIMENTAZIONE FARMACEUTICA**

Elaborato in

INGEGNERIA CLINICA

**Relatore
Prof. Claudio Lamberti**

**Presentata da
Claudia Caporale**

**I Sessione
Anno Accademico 2016/ 2017**

Indice

Introduzione	1
1. Microfluidica e micro-ingegneria	4
1.1 NOTE PRELIMINARI	4
1.2 FONDAMENTI DI MICROFLUIDICA	6
1.2.1. <i>Ipotesi di Fluido</i>	7
1.2.2 <i>Regime del Flusso</i>	7
1.2.3 <i>Legge di Poiseuille</i>	9
1.3 METODI DI FABBRICAZIONE E MATERIALI	11
1.3.1 <i>Soft-litografia</i>	11
1.3.2 <i>Replica Molding</i>	13
1.3.3 <i>Poli-dimetil-silossano (PDMS)</i>	14
2. Organs on Chip	17
2.1 PRODOTTO DI GARANZIA PER LA MEDICINA RIGENERATIVA	22
3. Heart on a Chip	23
3.1 DESIGN E FABBRICAZIONE DEL CHIP	24
3.2 CALCOLO DELLO STRESS DEL TESSUTO E DEL RAGGIO DI CURVATURA DURANTE UN CICLO CONTRATTILE	27
3.3 MODELLO DI UNA TERAPIA CELLULARE CARDIACA	30
3.3.1 <i>La meccanotrasduzione</i>	32
3.4 SINDROME DI BARTH (BTHS)	34
3.4.1 <i>Modellizzazione della BHTS su Heart on chip</i>	35
3.4.2 <i>Valutazione di potenziali terapie utilizzando BTHS iPSC-CM</i>	38
Conclusioni	40

Introduzione

La sintesi di nuovi farmaci è un processo molto lungo e dispendioso. Ogni nuovo farmaco nasce dall'individuazione, da parte dei ricercatori e dei chimici farmaceutici, di un'ipotesi di bersaglio farmacologico, ossia un meccanismo o un processo biologico su cui intervenire per modificare il decorso di una malattia.

A partire da questa ipotesi, si sintetizza il farmaco contenente il principio attivo responsabile dell'effetto terapeutico e si iniziano i vari step della sperimentazione.

Il farmaco [1] viene testato inizialmente su modelli teorici (in-silico), e successivamente su colture cellulari (in-vitro). Appurata l'efficacia potenziale sulle colture cellulari si passa alla sperimentazione animale (in-vivo). Se la sperimentazione in-vivo ha successo, il farmaco ha un accettabile grado di sicurezza per l'utilizzo, e inizia la sperimentazione clinica in cui bisogna verificare la reale tollerabilità ed efficacia sull'uomo.

Molti farmaci però non arrivano al trial clinico a causa della mancata stima della sua tossicità ed efficacia per gli uomini.

I test in-vitro sono prove su cellule o porzioni di cellule sia animali che umane. Queste cellule coltivate in laboratorio, in un ambiente che riproduce le dinamiche del corpo umano, si comportano quasi come un organismo vivente e possono fornire molte risposte ma in realtà sono un'approssimazione grossolana del comportamento cellulare nel tessuto. Le colture cellulari non sono un organismo e non possono fornire informazioni utili riguardo al metabolismo di potenziali farmaci. Ciò è di particolare importanza in quanto il metabolismo, e quindi la modificazione strutturale della molecola originale, può dare luogo a nuove specie molecolari che, a loro volta, possono avere rilevanza sia per gli effetti terapeutici sia per quelli collaterali di tipo tossico. Appare evidente che l'effetto dei farmaci può essere mal stimata in un modello cellulare in vitro.

Per i test in vivo [2] gli scienziati sono diventati molto attenti all'uso di animali per la ricerca. Da qualche anno l'associazione internazionale che valuta e accredita la cura degli animali da laboratorio (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC International)) offre un premio in denaro alla società o scienziato che più si impegna nel rispettare il principio delle "3R".

- Rimpiazzare (replacement): col maggior sforzo possibile il modello animale con uno alternativo, ad esempio alcuni esami molto dolorosi sono stati sostituiti da test su cellule di tessuti umani;
- Ridurre (reduce): al minimo il numero di soggetti animali testati nel protocollo sperimentale;
- Rifinire (refinement): quando non ci sono alternative possibili a quelle animali e non è possibile abbassare ulteriormente il numero di soggetti sperimentali, è importante che si tenga presente il benessere degli animali, dal trasporto, alla stabulazione, alle tecniche usate nelle procedure del protocollo sperimentale, all'eutanasia.

Il modello delle 3R nasce nel 1959 da due accademici britannici, Rex Burch e William Russell, membri della Universities Federation of Animal Welfare (UFAW), e si basa su dei principi che i ricercatori dovrebbero seguire per attuare una forma di sperimentazione animale più attenta al grado di sofferenza inferta ai soggetti sperimentali.

Le sperimentazioni in vivo producono risultati migliori delle sperimentazioni in vitro, ma, tuttavia nessuna specie animale può garantire risultati sperimentali affidabili per la specie umana. Nature¹, ha pubblicato un lungo articolo di critica al metodo di sperimentazione animale, in quanto non predittivo per la specie umana. Sono vari, infatti, gli esempi di farmaci testati su animali che si sono poi rivelati nocivi per l'essere umano.

Secondo recenti statistiche, per ogni farmaco approvato ed immesso sul mercato, altri 40.000 non superano la fase di sperimentazione. Le case farmaceutiche, ripartiscono i gravosi costi di produzione sul singolo farmaco approvato, influenzando pesantemente sul costo finale del farmaco approvato a danno dei consumatori. Da tutte queste considerazioni si nota che il processo di sintesi di un farmaco non è soddisfacente.

Una soluzione a questa problematica è rappresentata dallo sviluppo di una nuova e promettente tecnologia, denominata organs on chip, che consente di sintetizzare modelli funzionali di organi umani, con un potere predittivo nei test preclinici molto più ampio rispetto a quello attuale. Tutto ciò è reso possibile dalle nuove scoperte nel campo della biologia cellulare, della nanotecnologia e della microfluidica. Questa tecnologia ci permette di simulare e osservare direttamente la complessa risposta fisiologica del nostro organismo.

¹¹ **Nature** (volume 438, 10 novembre 2005)

Nel corso dell'elaborato analizzeremo dapprima i principi di funzionamento e i metodi di fabbricazione dei dispositivi microfluidici e successivamente ci concentreremo su alcune tipologie di organs on chip e su alcune loro applicazioni.

1. Microfluidica e micro-ingegneria

1.1 Note Preliminari

La microfluidica è un campo di ricerca innovativo che si basa sul comportamento e sulla manipolazione di piccole quantità di fluidi ($10^{-9}, 10^{-1}$ L) all'interno di canali cavi micrometrici (da 1 a 100 μm).

I primi dispositivi microfluidici sono stati introdotti negli anni 90' nel campo dell'elettroforesi capillare². Successivamente si sono diffusi con il termine "lab on a chip system", un sistema microfluidico che prevede il montaggio su un unico chip di tutti i componenti necessari a svolgere le diverse tappe di un processo chimico. La miniaturizzazione del sistema ha reso possibile l'esecuzione di migliaia di processi, in parallelo, in maniera automatizzata favorendo uno scaling up del processo produttivo e un risparmio dei reagenti da manipolare [3].

Le proprietà di flusso³ della microfluidica, l'uso di polimeri caratterizzati da alte prestazioni e basso costo, unite alle tecniche di micro fabbricazione come la soft litografia e il replica molding hanno mostrato che l'ambiente meccanico è cruciale per la crescita cellulare e la differenziazione dei tessuti.

Gran parte della potenza dei sistemi di coltura 3D⁴ risiede nella flessibilità delle colture in gel della matrice extracellulare (ECM) che consente alle cellule di cambiare forma e di creare connessioni cellulari impossibili da ottenere su supporti rigidi di coltura convenzionale. L'obiettivo di questa tecnologia è quello di progettare sistemi di coltura cellulare che imitano il microambiente fisico degli organi viventi, e replicano i segnali chimici naturali.

² L'elettroforesi è un esame che valuta la quantità e la tipologia di proteine nel sangue. Una tipologia di elettroforesi è quella capillare che si basa sulla capacità delle proteine di assorbire la luce. I campioni sottoposti ad un campo elettrico, vengono fatti scorrere all'interno di un capillare, e mentre migrano al suo interno vengono irradiati con un fascio di luce nello spettro ultravioletto. In base alla luce assorbita, il dispositivo determinerà il tipo di proteina e la sua quantità all'interno del campione [<http://www.medicina360.com/elettroforesi-proteica.html>].

³ Come vedremo in seguito i flussi nei microcanali sono puramente laminari perché le dimensioni del canale sono troppo piccole per la formazione di vortici.

⁴ La "coltura cellulare 3D" descritta è definita in larga misura come la coltura delle cellule viventi all'interno di dispositivi micro fabbricati con strutture 3D che imitano la microarchitettura tissutale e organica. Le colture cellulari in gel di matrice 3D sono denominate "colture a base di gel 3D ECM", "colture di gel 3D" o "colture convenzionali 3D"

Gli “Organs On Chip” (figura 1) sono dispositivi microfluidici destinati alle colture cellulari con funzionalità integrate, sono capaci di ricreare l'interfaccia tessuto-tessuto per mimare la microarchitettura dell'organo e di replicare il microambiente biochimico e meccanico specifico dell'organo. [4]

Questo risultato è stato raggiunto attraverso una serie di osservazioni,

- le molecole che si trovano nella matrice extracellulare, quando presentate in una configurazione bidimensionale possono indurre livelli di differenziazione tessuto-specifica simili a quelli presenti nelle colture gel di matrice extracellulare tridimensionali.
- le molecole se presentate su piccoli micro pozzetti isolati e piani che limitano la diffusione delle cellule, assumono le forme tonde o retratte che le cellule stesse mostrano quando coltivate su gel flessibili di ECM in 3D

Organ	Incorporated cell types	Demonstrated organ-specific features
Liver	Hepatocytes Vascular endothelial cells Fibroblasts	Serum protein synthesis Bile canaliculi Liver sinusoid Liver zonation
Lung	Airway epithelial cells Alveolar epithelial cells Pulmonary microvascular endothelial cells	Airway closure and reopening Small airway protein (CC10) synthesis Alveolar-capillary interface Surfactant production Lung inflammation Extrapulmonary absorption
Kidney	Renal tubular epithelial cells	Molecular transport
Gut	Intestinal epithelial cells	Intestinal absorption
Bone	Osteoblasts Osteocytes	Lacuna-canalicular network
Breast	Mammary epithelial cells Mammary fibroblasts Vascular endothelial cells	Malignant tumor invasion Cancer metastasis
Eye	Corneal epithelial cells Vascular endothelial cells	Epithelial barrier function
Brain	Neurons Astrocytes Oligodendrocytes	Axon-glia interaction Tumor angiogenesis

Figura 1: Elenco di organi microfabbricati (Trends in Cell Biology December 2011, Vol. 21, No. 12)

L'obiettivo di questa tecnologia non è quella di costruire un intero organo vivente, ma di sintetizzare la più piccola unità funzionale tridimensionale che rappresenti la biochimica, la funzione e lo sforzo meccanico che le cellule sperimentano nel nostro corpo. In questo capitolo vedremo quali sono le leggi fondamentali della microfluidica e quali sono le tecniche di micro fabbricazione e i materiali maggiormente usati per la costruzione di questa tecnologia.

1.2 Fondamenti di Microfluidica

In questo capitolo analizzeremo le leggi che descrivono il comportamento di un fluido all'interno di un capillare. È necessario tener conto della legge di scaling⁵, che descrive la variazione delle quantità fisica al variare della dimensione caratteristica del sistema (figura 2). Nel rispetto della regola associata ai sistemi miniaturizzati quando sono presenti due forze, quella dominante è quella che presenta un esponente minore. Pertanto a livello micrometrico, la forza di gravità è trascurabile rispetto a quella capillare, diventano preponderanti gli effetti della tensione superficiale, all'interfaccia tra le fasi del sistema, il moto del fluido è determinato dall'interazione tra esse.

Quantity	Scaling law
Intermolecular Van der Waals force	l^{-7}
Density of Van der Waals force between interfaces	l^{-3}
Time	l^0
Capillary force	l^1
Distance	l^1
Flow velocity	l^1
Thermal power transferred by conduction	l^1
Electrostatic force	l^2
Diffusion time	l^2
Volume	l^3
Mass	l^3
Force of gravity	l^3
Magnetic force with an exterior field	l^3
Magnetic force without an exterior field	l^4
Electrical motive power	l^3
Centrifugal force	l^4

Figura 2: Legge di scaling

(http://ftp-dee.poliba.it/Opto/Sistemi%20Micro%20e%20Nanoelettronici/AA%202009_2010-2014_2015/A.A.%202010-2011/Capitolo3_b%20PRINCIPI%20E%20APPLICAZIONI%20DELLA%20%20%20%20%20MICROFLUIDICA.pdf)

⁵ Il parametro "l" è inteso in due differenti modi a seconda che si stia considerando un oggetto isotropo o anisotropo: se è isotropo, l è l'ordine di grandezza della dimensione dell'oggetto. Se è anisotropo l è il parametro di scala che controlla tutte le dimensioni dell'oggetto

1.2.1. Ipotesi di Fluido

Definiamo fluido, la fase della materia in cui la sostanza è in grado di fluire, opponendo una piccola resistenza dovuta alla viscosità se sottoposta ad un sforzo di taglio. Da un punto di vista microscopico, la fase fluida è caratterizzata da forze intermolecolari deboli che non riescono a confinare le particelle che sono libere di muoversi. Il nostro modello sarà quello di:

- Liquido Continuo: il fluido è considerato composto da elementi infinitesimi di volume infinitesimo aventi una posizione, una velocità e una accelerazione. L'ipotesi regge se le dimensioni del capillare sono molto più grandi delle distanze intermolecolari. Negli organs on chip le dimensioni tipiche sono dell'ordine del micron, pertanto l'ipotesi è verificata con buona approssimazione;
- Liquido Incomprimibile: assumiamo che la densità ρ sia costante;
- Liquido Newtoniano: assumiamo che la viscosità non vari con la velocità, e sia, quindi, una costante.

L'equazione di continuità è valida anche in scala microscopica, tale approssimazione prevede di considerare i valori medi assunti dai parametri caratterizzanti il moto del fluido, e non invece di considerare le singole interazioni che occorrono tra le molecole di cui il fluido è composto.

1.2.2 Regime del Flusso

Il numero di Reynolds è una grandezza adimensionale che può essere usata per prevedere il regime del flusso. La velocità critica di un fluido v_c , che corrisponde ad un cambiamento nel regime di moto è proporzionale (k è all'incirca 2000 per molti fluidi) alla sua viscosità η ed è inversamente proporzionale alla sua densità ρ ed al diametro del condotto d (in un condotto a raggio costante) attraverso cui fluisce:

$$v_c = \frac{k \eta}{\rho d}$$

Se la precedente equazione viene riscritta sostituendo alla velocità critica la velocità

effettiva del fluido, il fattore k non è più una costante ma una variabile (Re) chiamata numero di Reynolds:

$$Re = \frac{\rho d v}{\eta}$$

ed esprime il rapporto tra forze inerziali e forze viscosi. In funzione del valore assunto dal numero di Reynolds, si discerne tra regime laminare e regime turbolento. In macro scala, valori del numero di Reynolds superiori a 2000 indicano flusso turbolento. Da una semplice analisi dimensionale è possibile osservare che, essendo il numeratore caratterizzato dal prodotto di una grandezza dell'ordine di 10^{-6} (il diametro del canale, in μm) per una velocità che, solitamente, per le applicazioni biomedicali, non eccede i 10^{-3}mm/s (ed avendo a denominatore una grandezza che, nella maggior parte dei casi di interesse è all'incirca pari all'unità) il flusso che ne deriva si distingue per un numero di

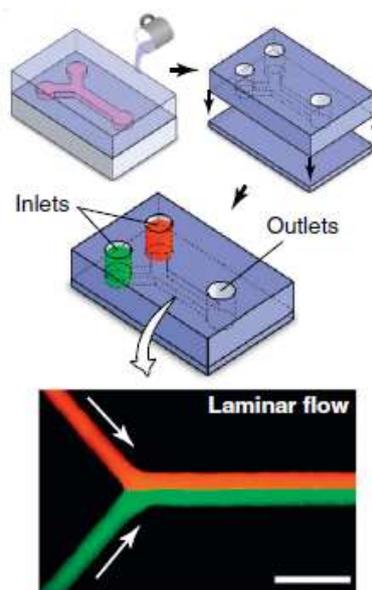


Figura 3: In questi microdispositivi, due fluidi (rossi e verdi) introdotti in entrate indipendenti si incontrano ad una giunzione a Y e entrano in microcanali rettilinei in cui fluiscono in flussi laminari adiacenti senza miscelazione (freccie indicano la direzione del flusso, barra di scala, 500 μm) (Trends in Cell Biology December 2011, Vol. 21, No. 12)

Reynolds che può essere estremamente basso [5]. Nei sistemi microfluidici (figura 3), il flusso è interamente laminare, e tra flussi vicini che scorrono uno accanto all'altro, dentro lo stesso canale cavo, non avviene nessuna miscelazione.

Negli organi su chip questa proprietà viene utilizzata su scala micrometrica per generare gradienti rapidi e improvvisi, per fornire apporti di sostanze chimiche attraverso il diametro di una singola cella e per mantenere gradienti chimici con forme complesse per molte ore al giorno, per studiare la motilità cellulare in risposta agli stimoli chemotattici. Inoltre è stato esteso a studiare comportamenti cellulari più complessi, come la differenziazione delle cellule staminali, l'orientamento dell'assone, la propagazione subcellulare della segnalazione biochimica e lo sviluppo embrionale nella coltura 2D, a sviluppare nuovi modelli di malattia (ad es. della malattia di Parkinson).

1.2.3 Legge di Poiseuille

Nell'ipotesi di moto stazionario, si ha flusso laminare e un fluido Newtoniano, è valida la legge di Poiseuille (figura 4)

$$Q = (p_1 - p_2) = \frac{\pi R^4}{8 \eta L}$$

dove $(p_1 - p_2)$ è la differenza di pressione tra le due estremità del tratto di canale di lunghezza L , R è il raggio del canale, η è la viscosità del liquido. Essendoci posti nella condizione di regime laminare, consideriamo due strati di fluido approssimabili con due piani rigidi: la forza F necessaria a trascinare uno dei due strati (forza trainante), considerando l'altro fisso, deve opporsi alla forza di attrito viscoso affinché si abbia moto stazionario ed è pari a:

$$F = \eta A \frac{dv}{dy}$$

dove A è l'area di contatto e $\frac{dv}{dy}$ è la variazione di velocità lungo l'asse trasverso a quello di traslazione. La legge di Poiseuille afferma dunque che la portata Q è funzione del

gradiente pressorio e della quarta potenza del raggio del canale e si applica a tubi rigidi, nelle ipotesi precedentemente indicate.

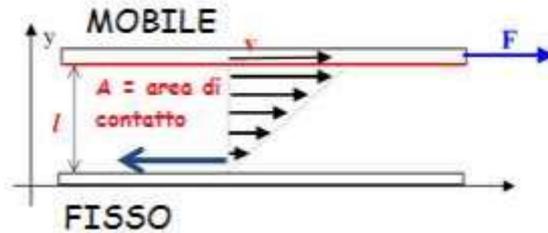


Figura 4: Legge di Poiseuille

([ftp://ftp-dee.poliba.it/Opto/Sistemi%20Micro%20e%20Nanoelettronici/AA%202009_2010-](ftp://ftp-dee.poliba.it/Opto/Sistemi%20Micro%20e%20Nanoelettronici/AA%202009_2010-2014_2015/A.A.%202010-)

2011/Capitolo3_b%20PRINCIPI%20E%20APPLICAZIONI%20DELLA%20%20%20%20%20%20MICROFLUIDICA.pdf)

A causa della viscosità dei liquidi e dell'attrito di questi contro le pareti dei canali, il flusso non ha un fronte di velocità $\frac{dv}{dy}$ uniforme in una sezione, ma presenta velocità più alte al centro e via via più basse quanto più ci si avvicina alle pareti. Tale caratteristica è propria del flusso laminare e la differenza di velocità tra il centro e la periferia è tanto più marcata quanto più il canale ha sezione piccola. Se ipotizziamo di aumentare gradatamente la velocità di un flusso in un condotto diminuendone corrispondentemente la sua sezione, essa raggiungerà un valore critico dopo il quale il flusso non sarà più laminare ma turbolento.

1.3 Metodi di Fabbricazione e Materiali

I sistemi di coltura microfluidica sono fabbricati con la tecnica della soft-litografia, un processo a basso costo che permette di controllare la funzionalità del dispositivo in scala micrometrica, attraverso la fabbricazione e l'utilizzo di repliche elastomeriche. Tale procedura permette di microfabbricare dispositivi che richiedono un alto livello di controllo. La soft-litografia permette di inserire il pattern inciso sul chip in silicio, in un materiale biocompatibile e più flessibile. Si ottiene una specie di timbro di gomma, il "master mold", un materiale otticamente chiaro. La Soft-litografia è stata utilizzata inizialmente per un chip in cui bisognava fissare le molecole dell'ECM (matrice extra cellulare) in dei micropozzetti isolati, e specificarne la forma, la posizione e la funzione delle cellule in coltura sul chip di silicio. Successivamente, questo approccio è stato modificato pressofondendo e lasciando asciugare il substrato di silicio nello stampo in PDMS, sigillandolo poi con un substrato piatto liscio, come il vetro, così da creare cavità aperte (sezione $<1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$), dette "canali microfluidici", con delle aperture in entrambe le estremità del polimero per consentire la perfusione di liquidi. I bioreattori a perfusione miniaturizzati per la coltura di cellule sono costituiti dalle molecole ECM che rivestono la superficie del canale centrale, in cui scorrono le cellule sempre perfuse [6].

1.3.1 Soft-litografia

La soft-litografia si basa sugli stessi principi della litografia tradizionale, ma ne supera alcuni limiti. La litografia convenzionale, utilizzata in microelettronica, è il processo che permette di realizzare strutture tridimensionali su materiali rigidi, tipicamente semiconduttori inorganici. La soft litografia necessita della tecnica tradizionale per la fabbricazione del master, realizzato in semiconduttore.

La fabbricazione del master, (figura 5) è in sintesi:

- Deposizione di uno strato uniforme di un polimero organico sensibile alla luce (photoresist) sul substrato di silicio tramite spin coating⁶ ;

⁶ Rivestimento del substrato e deposizione di un film sottile ottenuto sfruttando la forza centrifuga generata da una rapida rotazione

- Copertura/sovrapposizione di una maschera sensibile alla luce (photomask) (ad esempio, una lastra di vetro trasparente modellata con strati cromati opachi) che ha un pattern generato tramite un software di design;
- Esposizione di alcune parti del photoresist a luce ultravioletta (UV) ad alta intensità) secondo il pattern della photomask che protegge alcune zone.
- Rimozione del resist dalle regioni esposte (resist positivo) o non esposte (resist negativo) al fascio di fotoni. Il materiale esposto a UV si dissolve in una soluzione di sviluppo ⁷, lasciando il disegno della maschera inciso nel photoresist;

Al termine di queste operazioni si ottiene il cosiddetto ‘master mold’ che, verrà usato per ottenere le ‘copie’ del chip da produrre. Il ciclo di vita del ‘master mold’ è limitato da una serie di fattori quali, ad esempio, il danneggiamento progressivo causato dal contatto con il polimero. Per questi motivi si procede, a stampare alcune repliche del master mold finale [7].

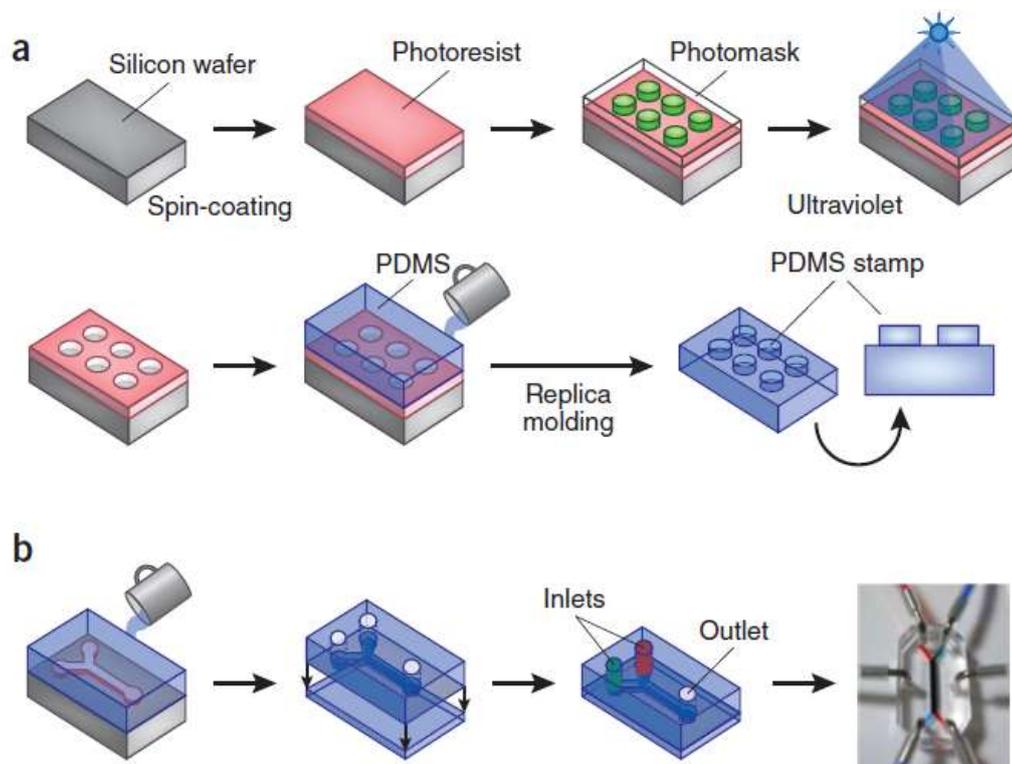


Figura 5: step nella fabbricazione di un organ on chip
(nature biotechnology volume 32 number 8 august 2014)

⁷ La struttura multistrato così ottenuta, può diventare uno stampo per il materiale polimerico in processi di replica molding; di norma questa tecnica è utilizzata per ottenere microcanali di 50-100 μm

1.3.2 Replica Molding

Lo step finale nel processo di produzione dei chip consiste nella modellazione di un pre-polimero attraverso il master mold in modo da ottenere una copia (negativa) del master. Le repliche elastomeriche sono realizzate con la tecnica del replica molding in cui il pre-polimero liquido di PDMS viene gettato sulla parte superiore del modello precedentemente realizzato, inciso, polimerizzato e sbucciato. Il timbro in PDMS può essere utilizzato per posizionare con la microcontact printing le molecole della ECM su qualsiasi supporto, inclusi quelli all'interno di dispositivi microfluidici. La risoluzione ottenuta in un processo di replica molding dipende dalla geometria del master.

Le repliche in PDMS per creare i canali su un substrato di vetro sono state fabbricate secondo la seguente procedura:

- Preparazione del PDMS: il pre-polimero è miscelato all'agente polimerizzante in rapporto di peso 10:1, anche variazioni minime del rapporto causano differenze significative nelle proprietà meccaniche del PDMS.
- Eliminazione delle bolle: il miscelamento causa la formazione di bolle all'interno del PDMS. Pertanto viene lasciato riposare circa 30 minuti sottovuoto, fino alla completa eliminazione delle bolle.
- Replica Molding: il PDMS viene colato sul master. Si utilizza un anello in metallo centrato nel master per evitare che l'elastomero si spanda in modo eccessivo. La quantità di sostanza da utilizzare è tale da realizzare una replica sottile (sotto il millimetro), in modo da favorire in seguito il conformal contact con un substrato rigido qual è il vetro. Si lascia riposare per pochi minuti in modo da permettere alla miscela di penetrare anche nelle zone più complesse del master, poi si pone il dispositivo in una camera a vuoto per accelerare il processo e rimuovere le microbolle d'aria formatesi durante la colata.
- Polimerizzazione: il dispositivo è posto in stufa, a 140° C per 15 minuti in modo da permettere la polimerizzazione. La replica viene quindi sollevata dal master nella direzione dei canali per evitare danneggiamenti, e tagliata in modo da eliminare i bordi rialzati dovuti all'adesione del PDMS all'anello metallico.

1.3.3 Poli-dimetil-silossano (PDMS)

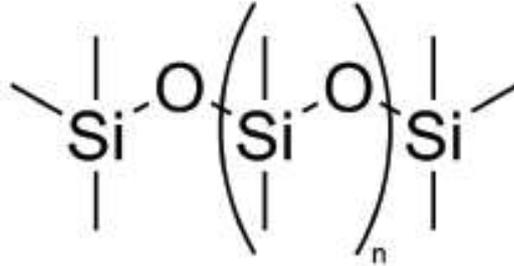


Figura 6 Formula di struttura del PDMS

<http://www.xpolymers.it/polidimetilsilossano.html>

Il Polidimetilsilossano (figura 6) è l'elastomero più usato per la produzione di dispositivi microfluidici, è un polimero costituito dal concatenamento di monomeri $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}$, appartiene alla famiglia dei silossani, noti comunemente come siliconi (figura 6). La polimerizzazione è innescata da un agente polimerizzante; tale processo avviene solitamente a temperature di centinaia di gradi centigradi, o anche a temperatura ambiente ma più lentamente (circa 48 ore). Durante la polimerizzazione il PDMS riduce il suo volume dell'1%. La temperatura di transizione vetrosa del PDMS è -125°C . Anche se resistente alle alte temperature, il polimero si degrada completamente e relativamente veloce in ambiente naturale e quindi non presenta alcun problema ambientale significativo. [8]

Dai legami chimici che lo contraddistinguono si possono individuare alcune proprietà distintive del PDMS, tra cui una buona stabilità termica, bassa tensione superficiale e trasparenza (fin sotto i 280 nm). Dal punto di vista biomedico il PDMS viene apprezzato per la propria inerzia, stabilità e non fluorescenza. Ha un ottimo imaging ottico in tempo reale, alta risoluzione di risposte cellulari, basso modulo elastico, è biocompatibile, è relativamente facile da fabbricare, ha eccellenti proprietà ottiche sia per la trasmissione della luce che per la microscopia a fluorescenza, il tutto lo rende adatto all'impiego nelle applicazioni biologiche.

Per quanto riguarda invece le applicazioni nella microfluidica il PDMS si contraddistingue per la sua permeabilità ai gas, il comportamento elastico e le proprietà di superficie.

Permeabilità: è data dal prodotto tra la solubilità di un gas nel polimero e la sua diffusività. La permeabilità del PDMS risulta sensibilmente più elevata se confrontata con quella di altri materiali elastomerici. Nel caso particolare di colture cellulari, tuttavia, valori più alti di permeabilità potrebbero influenzare i risultati sperimentali a causa di fenomeni di evaporazione o di cambio del pH dovuti alla diffusione di CO₂. Una soluzione tecnica per limitare la permeabilità è presaturare il PDMS con un liquido o incrementando la quantità di agente reticolante in fase di polimerizzazione.

Elasticità: Una buona elasticità è data dal fatto che il PDMS esiste in una conformazione altamente avvolta. Sotto carico, il polimero si stira, quando la tensione viene rilasciata, il polimero si riavvolge, tornando alla forma originale. L'elasticità si basa quindi sulla capacità delle regioni polimeriche adiacenti di scivolare oltre l'una all'altra. L'elasticità è direttamente influenzata dalla quantità di reticolazione. Più il PDMS è reticolato, tanto meno è elastico. Tuttavia, in microfluidica, l'elasticità è una moneta a due facce. A seconda delle pressioni utilizzate per il trasporto del fluido, le pareti dei microcanali si deformano, la pressione aumenta e la portata è ridotta.

Proprietà Superficiali: il PDMS non trattato è altamente idrofobico a causa della presenza dei gruppi metilici. Tale idrofobicità è responsabile della bassa bagnabilità in presenza di solventi acquosi e determina un adsorbimento aspecifico di proteine e cellule. Altro fattore molto importante legato a questa proprietà, soprattutto in fase di funzionamento del chip, è la tendenza dei microcanali in PDMS di intrappolare bolle d'aria eventualmente presenti nel liquido al loro interno.

Specificatamente per gli organs on chip la chiave per l'incisione controllata del PDMS, risiede nella scelta del solvente appropriato per l'incisione. Il solvente deve sciogliere il prodotto della reazione di attacco, ma non deve gonfiare in modo significativo il polimero indurito. L' N-metilpirrolidinone (NMP) dissolve i prodotti dell'agente di attacco, ma gonfia il PDMS solo leggermente; il leggero gonfiore non rompe il sigillo che contiene i microcanali. I fluidi vengono introdotti nel sistema capillare tramite gli ingressi e vengono pompati per aspirazione attraverso i canali con pressione a vuoto costante. Questo avviene versando un polimero liquido, il poli-dimetilsiloxano (PDMS), sul substrato di silicio, permettendo al PDMS di polimerizzare in un materiale otticamente trasparente e gommoso. [9, 10]

Tuttavia, utilizzare il PDMS ha alcune limitazioni che non sono state ancora risolte:

- Problemi di adsorbimento specifico;
- Possibile rigonfiamento in presenza di solventi apolari;
- Permeabilità alle piccole molecole idrofobiche,
- Problemi nelle fasi di montaggio a causa del lento indurimento termico
- Riduzione dell'1% in fase di reticolazione.
- Attenta valutazione dell'aspect ratio A definito come il rapporto tra la larghezza e l'altezza di una struttura. Alcuni studi hanno dimostrato che il valore ottimale è compreso tra 0.2 e 1. Aspect ratio troppo bassi o elevati possono causare deformazioni e distorsioni della struttura in PDMS, (figura 7).

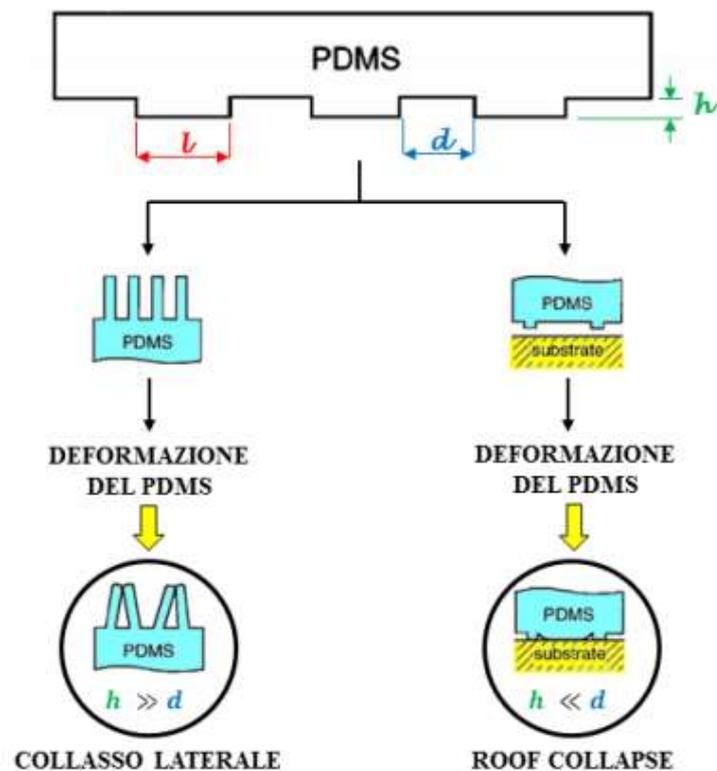


Figura 7: Illustrazione esemplificativa dei casi limite che si verificano in presenza di valore di aspect ratio non ottimali. A destra il caso di un aspect ratio elevato che porta al collasso laterale del PDMS, a sinistra caso di aspect ratio troppo basso che determina il “crollo del soffitto” della struttura

https://www.politesi.polimi.it/bitstream/10589/78001/3/23_04_GAZANEO.pdf

2. ORGANS ON CHIP

La tecnologia Organ-on-chip è stata impiegata per sviluppare modelli in vitro, per predire in modo ottimale e con un costo contenuto, l'efficacia, la tossicità, la farmacocinetica e lo screening fenotipico⁸ del farmaco nell'organismo umano durante la sperimentazione preclinica. Le sperimentazioni precliniche classiche hanno spesso scarsa efficacia poiché non riescono a prevedere alcuni effetti terapeutici del farmaco e qualora sia necessaria l'aumento del dosaggio a causa delle tossicità possibile.

Sono stati fabbricati diversi "Organ on a Chip", sistemi microfisiologici che contengono cellule umane viventi coltivate all'interno di dispositivi microfluidici che replicano le interfacce tissutali tridimensionali (3D), i microambienti meccanicamente attivi, gli stimoli elettrici, le condizioni chimiche e la funzionalità dell'organo, si è ottenuto un polmone che respira, un cuore che batte, un fegato che metabolizza, un intestino peristaltico, il midollo osseo auto-rinnovabile, ne vedremo alcuni esempi e ci concentreremo in modo particolare sul cuore.

- *Liver on a chip (fegato)*: Il fegato [11,12] ha un ruolo molto importante nella fisiologia e nella farmacologia, è responsabile infatti di processi come la disintossicazione, la sintesi proteica, e la produzione di molecole bioattive. La maggior parte dei farmaci passano attraverso il fegato, e quindi è molto importante capire come un farmaco viene metabolizzato da esso. Un fegato su chip replica la microarchitettura epatica. L'unità funzionale di questo microsistema è costituita da una camera di coltura di cellule epatiche e da un canale di flusso di nutrienti circondato da strutture a barriera fabbricate e modellate con una serie di microcanali stretti (2 mm di larghezza) che imitano la barriera endoteliale altamente permeabile tra gli epatociti e i sinusoidi epatici (figura 8). La geometria della camera di coltura cellulare promuove l'allineamento lineare di epatociti in due righe, facilita la produzione di canali funzionali biliari lungo le strutture del cavo epatico.

⁸ Lo screening fenotipico è un tipo di screening utilizzato nella ricerca biologica e nella scoperta di farmaci per identificare sostanze come piccole molecole, peptidi o RNAi che alterano il fenotipo di una cellula o di un organismo in modo desiderato.

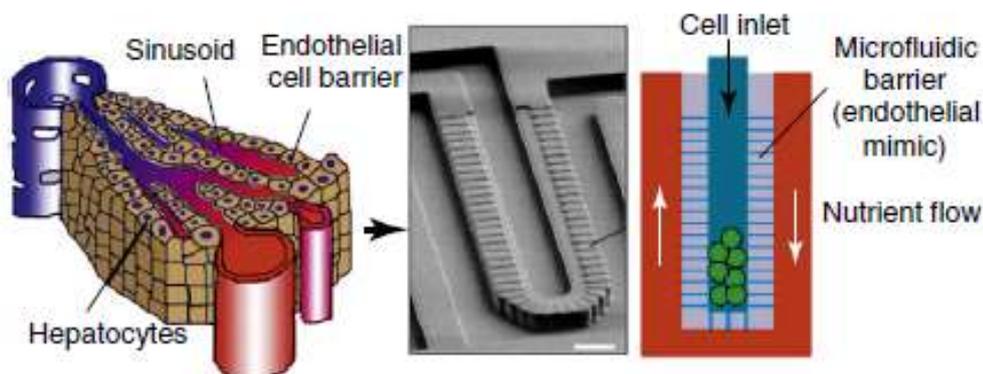


Figura 8 Liver on a chip, microambiente epatico
Trends in Cell Biology December 2011, Vol. 21, No. 12)

- *Gut on a chip (intestino)*: Un intestino umano su chip è stato utilizzato per produrre una co-coltura di batteri commensali⁹ a contatto con cellule epiteliali umane intestinali viventi per più di una settimana in vitro e per analizzare in che modo il microbioma intestinale, le cellule infiammate e i movimenti peristaltici contribuiscono alla crescita e all'infiammazione batterica intestinale (figura 9). Questo modello ha replicato i risultati degli studi passati sugli animali e sugli esseri umani, mostrando ad esempio che le terapie probiotiche e antibiotiche possono sopprimere le lesioni dei villi indotti dai batteri patogeni. Senza la simulazione dei movimenti peristaltici, mantenendo però il flusso laminare si vede che la mancanza di deformazione epiteliale ha provocato la sovrapposizione batterica simile a quella osservata nei pazienti con ileo e malattia infiammatoria intestinale. L'analisi dell'infiammazione intestinale sul chip ha rivelato che le cellule immunitarie e l'endotossina dei lipopolisaccaridi insieme stimolano le cellule epiteliali per produrre quattro citochine pro infiammatorie (IL-8, IL-6, IL-1 β e TNF- α) necessarie e sufficienti per indurre lesioni ai villi e compromettere la funzione di barriera intestinale. Pertanto, questo gut-on-chip umano può essere utilizzato per analizzare i contributi del microbioma intestinale e i meccanismi della malattia in modo controllato [13].

⁹ I batteri commensali sono quelli che non arrecano né danni né vantaggi all'organismo colonizzato.

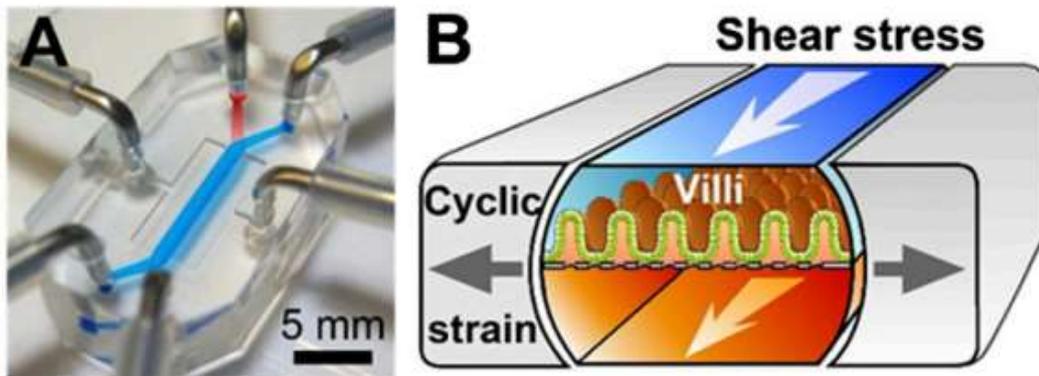


Figura 9: Gut on a chip, replicazione movimenti peristaltici

Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip”, January 5, 2016 vol. 113 no. 1, doi: 10.1073/pnas.1522193112

- *Kidneys on chips (reni)*: La tossicità renale è uno degli eventi avversi più frequentemente riportati durante lo sviluppo di farmaci. La mancanza di precisi modelli di coltura cellulare e l'inaffidabilità degli studi sugli animali hanno creato la necessità di approcci migliori per ricapitolare la funzione renale in vitro. È stato fabbricato un dispositivo microfluidico fiancheggiato da cellule epiteliali umane di reni umane esposte a flusso fluido che imita le funzioni chiave del tubulo prossimale del rene umano (figura 10). Le cellule epiteliali primarie del rene isolate dal tubo prossimale umano vengono coltivate sulla superficie superiore di una membrana porosa in poliestere, rivestita con matrice extracellulare che suddivide il canale principale del dispositivo in due canali adiacenti, creando così un canale apicale "luminale" e uno basale "interstiziale". L'esposizione del monostrato epiteliale a uno stress apicale (0.2 dyne cm²) che simula la funzione dei tubuli renali vivi porta ad una maggiore polarizzazione delle cellule epiteliali e alla formazione delle cilia primarie, fenomeno che non avviene nei tradizionali sistemi di coltura Transwell¹⁰. Questi dati indicano che questo tubulo prossimale-su-chip potrebbe fornire un utile modello in vitro per studiare la fisiologia renale e le nefrotossicità che molti farmaci causano. Poiché questo dispositivo consente la visualizzazione diretta e l'analisi quantitativa di diversi processi biologici del

¹⁰ I sistemi di coltura Transwell sono dispositivi di supporto permeabili comodi e semplici da usare per lo studio di linee cellulari adesione-dipendenti e ancoraggio-dipendenti. Sono destinati alla creazione di un ambiente per colture cellulari molto simile allo stato *in vivo*.

tubo renale intatto in modi che non sono stati possibili in tradizionali culture di cellule o modelli animali, può anche rivelarsi utile per la ricerca di meccanismi fondamentali molecolari che sono alla base della funzione renale e della malattia [14].

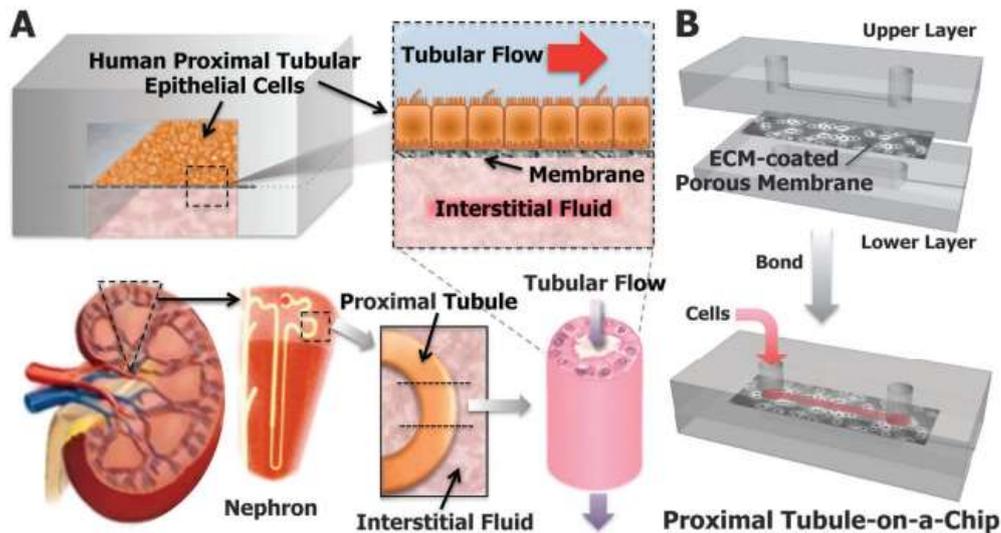


Figura 10 A. Struttura kidney on a chip, canale apicale e interstiziale rispetto ad un nefrone, B. Dispositivo assemblato, (Integr. Biol., 2013,5, 1119)

- Brain blood barrier on a chip (BBB): la BBB [15] svolge un ruolo importante nella omeostasi del cervello e impedisce l'accesso al cervello a tutte le sostanze tossiche. Questo chip (figura 11) è utile per lo sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento di malattie neurodegenerative. Hanno introdotto cellule endoteliali hCMEC /D3 del cervello umano nel dispositivo microfluidico e hanno valutato la funzionalità di uno strato di cellule prestabilito come modello BBB misurando la resistenza elettrica trans-endoteliale (TEER). I dati ottenuti hanno confermato che le cellule endoteliali nel chip sono a giunzione stretta. In confronto ai vecchi esperimenti il chip BBB ha mostrato un maggiore TEER, che serve a valutare un nuovo farmaco.

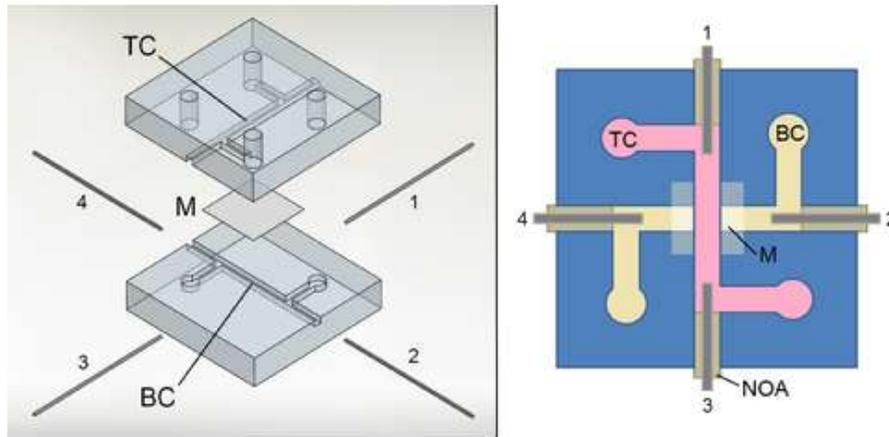


Figura 11 Schematizzazione del chip: TC (top channel), compartimento in cui vengono coltivate le cellule epiteliali del cervello, BC (bottom channel) è il cervello, M è la membrana porosa, 1,2,3,4 elettrodi in platino per misurare il TEER (<https://www.utwente.nl/ewi/bios/research/biomedical/bbb>)

- Bone-marrow-on-a-chip (midollo osseo): delle cellule indotte ossee racchiuse in una camera polimerica sono state impiantate in un ratto per generare nuovo tessuto osseo, ospitante un midollo osseo compatibile, che è stato poi rimosso dalla camera e coltivato in un dispositivo microfluidico (figura 12)

Il bone-marrow-on-a-chip (midollo osseo) [16] ha ricostituito un ambiente ematopoietico tridimensionale preservando la funzionalità del midollo osseo, la distribuzione spaziale e le proporzioni fisiologiche delle cellule staminali ematopoietiche e delle cellule progenitrici in vitro. In questo sistema, a fare da input stimolante sono stati le colonie di granulociti che hanno promosso il recupero del midollo osseo dopo l'esposizione a dosi clinicamente rilevanti di radiazioni gamma, un risvolto terapeutico questo, che non era possibile vedere nei sistemi di coltura del midollo osseo convenzionali.

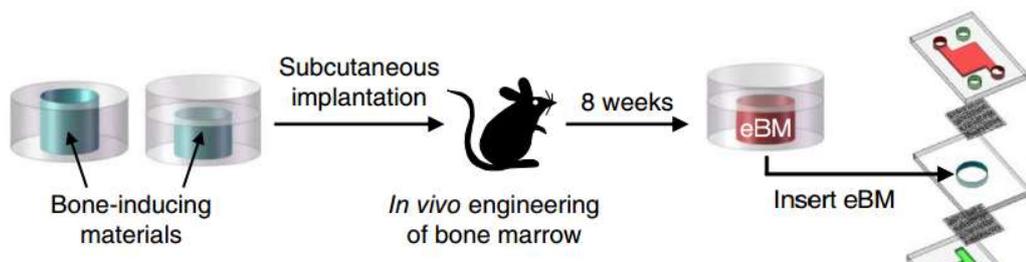


Figura 12 Flusso di lavoro per generare un sistema di midollo osseo su un chip in cui l'eBM viene formato in un dispositivo PDMS in vivo e viene quindi coltivato in un sistema microfluidico (Nature Methods. 2014; 11:663–669. [PubMed: 24793454])

2.1 Prodotto di Garanzia per la Medicina Rigenerativa

Spesso le sperimentazioni cliniche per malattie croniche e degenerative non riescono a curare i pazienti, ma sono in grado di fornire più tempo attraverso cure parziali e palliative.

La medicina rigenerativa [17] nasce come possibile soluzione a questi problemi, si propone di rimpiazzare e rigenerare i tessuti e le cellule che hanno perso le loro funzionalità meccaniche con cellule staminali. Gli scienziati, però, non sono ancora riusciti a ricreare completamente il fenotipo cellulare. Nelle terapie rigenerative si può seguire solo un modello concettuale di fabbricazione, le cellule rappresentano la materia prima e il prodotto finale e nonostante si seguano tutte le metodologie previste per la rigenerazione dei tessuti non si riesce ad avere un prodotto sicuro e funzionale a causa della eterogeneità dei pazienti.

La tecnologia Organ on Chip si sta rivelando un sistema di qualità e garanzia per la medicina rigenerativa. Replicando in tutti gli aspetti la fisiologia dell'organo, con un modello matematico di facile comprensione, si riesce a valutare il fenotipo attraverso la misura di alcuni parametri come l'espressione genica, la struttura, il metabolismo e dalla posizione di alcune cellule nei microambienti si capisce se l'organo è sano o malato. Inoltre la possibilità di usare cellule specifiche di un paziente, permette di capire se ci potrebbero essere patologie ereditarie, al costo di una sperimentazione preclinica.

Gli organs on chip offrono una visione della biologia semplificata, il che facilita lo sviluppo di strutture flessibili matematiche e computazionali per collegare una fenotipizzazione completa ai meccanismi di riparazione e rigenerazione.

Questo obiettivo sarà raggiunto utilizzando gli organi su chip con

- microambienti sani e malati per la modellizzazione delle malattie genetiche e acquisite;
- sensori e attuatori per controllare le risposte patofisiologiche in tempo reale;
- body on a chip dato dall'unione di diversi chip per catturare complesse interazioni sistemiche

3. Heart on a Chip

Il Sistema cardiovascolare è composto da tre blocchi funzionali: il *cuore* è la pompa che genera la pressione necessaria per far circolare il *sangue* lungo una serie di canali (*vasi sanguigni*) che determinano il sistema vascolare.

Funzionalmente, gli elementi più importanti del cuore sono i cardiomiociti, cellule contrattili che generano e trasmettono autonomamente l'impulso contrattile, sono lo scheletro fibroso del cuore, un insieme di robuste formazioni connettivali fatte da collagene e fibre elastiche, e da canali che trasmettono gli impulsi elettrici.

Fino ad oggi è sempre stato impegnativo replicare microambienti con funzione contrattile ed elettrofisiologica. I cardiomiociti, ad esempio, depolarizzandosi, originano un potenziale d'azione che si propaga e attiva altre cellule, facendo contrarre il cuore. Sino ad oggi sono state sviluppate una serie di tecniche che misurano efficacemente la contrattilità delle cellule, che però non riescono a simulare la struttura anisotropa dei ventricoli cardiaci, a raccogliere dati morfologici ed elettrofisiologici, e a renderli adatti ai protocolli di analisi HTS (High throughput screening).

Recentemente è stato progettato un heart on chip, un dispositivo microfisiologico basato sulla tecnologia MTF (muscular thin film) che fornisce in modo continuo informazioni sulla contrazione del tessuto cardiaco nel tempo (figura 13 a,b), sulla propagazione dell'impulso e sull'organizzazione dell'architettura cellulare.

Ogni chip è composto da tre componenti principali:

- Cantilever multilayer: composti da uno strato base, su cui è inserito un sensore che misura lo sforzo e uno strato di guida tissutale che promuove l'autoassemblaggio dei tessuti laminari fisiomimetici progettati dai miociti ventricolari del ratto neonatale (NRVMs) e dai cardiomiociti derivanti da cellule staminali pluripotenti indotte dall'uomo (hiPS-CMs);
- Interconnessioni elettriche per la lettura;
- Otto pozzi indipendenti (Figura 13 c-1).

Il cuore su chip facilita, per diverse settimane, la coltura tissutale, le analisi non invasive della forza contrattile del tessuto e facilita gli studi farmacologici all'interno di un ambiente incubatore controllato.

3.1 Design e Fabbricazione del chip

Per creare questo dispositivo integrato, vengono modellati in sequenza sei materiali con la stampa 3D a più dimensioni. [18]

La posizione del substrato e di quattro ugelli indirizzabili singolarmente sono determinate da un processo automatizzato di calibrazione affinché si abbia la corretta integrazione dei materiali. Per replicare lo stress generato dai tessuti cardiaci laminari che va da 1 a 15 kPa, lo spessore e la stabilità di ciascun cantilever deve essere minimo; questa specifica è stata soddisfatta usando una serie di inchiostri a base di polimeri altamente diluiti (0,5 - 6,5 μm di spessore). Le dimensioni laterali invece sono ottenute regolando la velocità di evaporazione del solvente, la viscosità dell'inchiostro, il comportamento di bagnatura e di diffusione.

Il chip viene stampato con un singolo processo continuo.

- A) Vengono stampati prima i film in dextran (spessore 0,5 μm) (Figura 13 c), essi fungono da strati di rilascio sacrificiali biocompatibili, idrosolubili, permettendo ai cantilever finali di staccarsi dal substrato e di deviare liberamente.
- B) In seguito, vengono stampati cantilever con inchiostri poliuretanic termoplastici diluiti (TPU), la base e le coperture del telaio sono stampate con un inchiostro TPU semplice, mentre i fili degli estensimetri sono stampati utilizzando un inchiostro TPU composto per il 25% da nanoparticelle di carbonio (CB: TPU). I componenti TPU hanno un modulo di Young di 1.6 MPa, mentre quelli CB: TPU hanno modulo di Young di 8,8 MPa, sono piezo-resistivi con resistività di 1,19 Ωcm .
- C) Il resto del cuore su chip viene stampato utilizzando inchiostri viscoelastici ottimizzati per la deposizione di strutture autoportanti. Su ogni cantilever vengono stampati con un inchiostro viscoso di polidimetilsilossano (PDMS) (modulo di Young di 1,28 MPa), dei filamenti di larghezza 60 μm (figura 13 g). Questi filamenti compongono la maggior parte dello spessore del cantilever e servono come supporto diretto al tessuto cardiaco laminare fisio-mimetico.
- D) I componenti elettrici e i contatti vengono stampati utilizzando un inchiostro ad alta conducibilità, il poliammide, un polimero con particelle d'argento (Ag: PA) (Figura 13h). Una volta che l'inchiostro si è asciugato, i componenti elettrici

presentano una resistività elettrica di $6,6 \times 10^{-5} \Omega\text{cm}$. I cavi conduttori sono ricoperti da uno strato isolante.

- E) Otto pozzetti indirizzabili individualmente sono stampati utilizzando inchiostri di PDMS o di polimeri termoplastici rigidi biocompatibili come l'acido polilattico (PLA) o l'acrilonitrile butadiene stirene (ABS). I polimeri rigidi sono preferibili per la sperimentazione farmaceutica poiché sono meno inclini all'assorbimento di massa di farmaci idrofobici rispetto al PDMS (Figura 13 i)

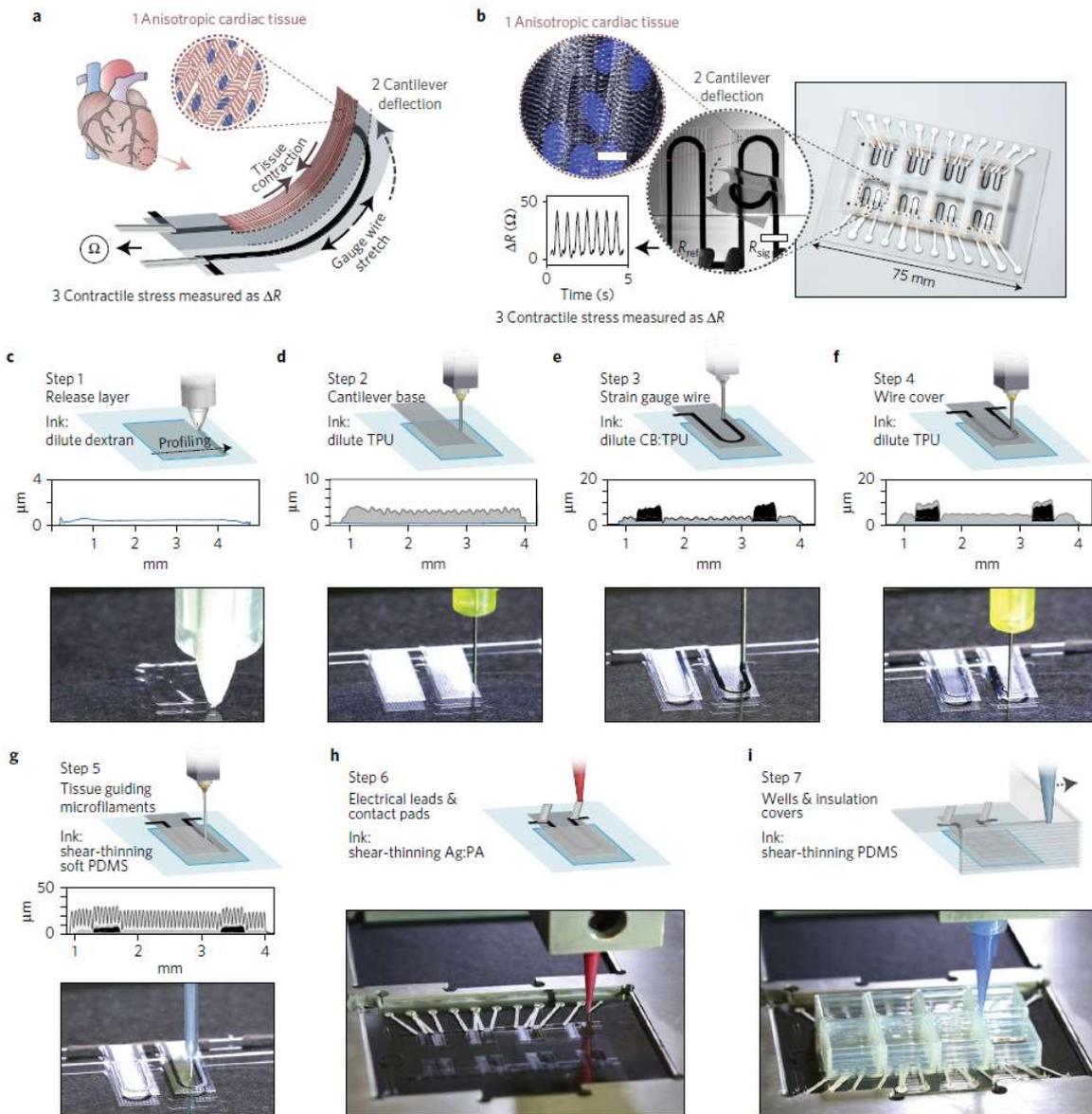


Figura 13 Designi del dispositivo e procedura di stampa 3D su microscala. a) Schizzo del principio del dispositivo. Contrazione di un tessuto cardiaco anisotropico ingegnerizzato (1) deflessione del cantilever (2), allungamento di un estensimetro incorporato nel cantilever, la variazione di resistenza è proporzionale allo stress contrattile del tessuto (3). b) Dispositivo finale. (1) Immagine confocale di microscopia del tessuto immunitario laminare NRVMcardiac (2) immagini di un cantilever che deflette sulla contrazione tissutale. (3) Esempio di segnale di resistenza. c-l) Stampa del dispositivo su un substrato a scorrimento in vetro in sette passi sequenziali

3.2 Calcolo dello stress del tessuto e del raggio di curvatura durante un ciclo contrattile

Quando il film è poggiato sul vetro, il suo raggio di curvatura (r) è infinito, quindi la lunghezza del film (L) può essere misurata direttamente. Quando il film protettivo si scioglie il film si piega di un raggio corrispondente alla tensione diastolica del tessuto. Durante la contrazione, il raggio di curvatura diminuisce fino a raggiungere un picco durante la sistole. [19]

In questi esperimenti i film vengono visti dall'alto, abbiamo quindi solo una proiezione orizzontale di ciò che avviene. Durante la sistole, la proiezione si "accorcia", (barre rosse in Fig 14 a).

Nella fig. 14b vediamo come varia la proiezione x durante il ciclo di contrazione. Il film durante la contrazione si piega seguendo un arco di circonferenza ($\theta = L/r$) viene tagliato in modo da non riuscire a formare una circonferenza completa, in quel caso il film entrerebbe in contatto con sé stesso e il raggio di curvatura non sarebbe più costante lungo il film.

La proiezione varia lungo l'intervallo $(L/2\pi) \leq x \leq L$

- Se $\theta \geq \pi/2$, la proiezione lungo x cala col raggio: $x = r \sin(L/r)$
- Se $\theta < 2\pi$, la proiezione $x = r$

Quando x si avvicina alla intera lunghezza del film il raggio di curvatura aumenta rapidamente. Tuttavia, questo non determina un problema nel calcolo dello stress poiché il raggio è molto piccolo rispetto al picco della sistole. Per migliorare la precisione della misura in caso di miociti deboli o di uno strato di PDMS spesso si taglia una serie di film in fila (dai 2 ai 4 film, lunghi 8 mm).

Il raggio di curvatura è stato utilizzato per calcolare lo stress per frame considerando il film come una trave avente deformazione piana a due strati, per il PDMS e i cardiomiociti attivi e passivi si è usato il metodo del volume di crescita. Come mostrato in alcuni studi parametrici¹¹ il raggio di curvatura osservato per una stessa tensione dipende dallo spessore del PDMS e dello strato di cellule. Mentre per i cardiomiociti si assume sempre uno spessore medio di 4 mm, lo spessore dello strato di PDMS è stato misurato per ogni esperimento con un profilometro.

¹¹ P. W. Alford, A. W. Feinberg, S. P. Sheehy and K. K. Parker, *Biomaterials*, 2010, 31, 3613–3621

A differenza del raggio di curvatura, la sollecitazione calcolata potrebbe essere confrontata tra MTF di chip con diversi spessori di PDMS. La possibilità di variare lo spessore dello strato PDMS estende la gamma di sollecitazioni misurabili entro il limite di deformazione $(L/2\pi) \leq x \leq L$.

Negli esperimenti effettuati con il cuore su chip, ogni film rappresenta un campione sperimentale indipendente, con il proprio profilo di stress (Fig 14 a). Lo sforzo prodotto dalla pressione sistolica e diastolica ad una temperatura di 37 gradi e con una frequenza di 2 Hz è stato calcolato da tre chip utilizzando in totale 20 film, il tessuto era una sezione del muscolo ventricolare destro di un ratto (Fig 15). Anche se sono stati usati cardiomiociti 2D per il film, che non riescono a replicare perfettamente la struttura 3D del miocardio, lo sforzo medio sistolico aveva un range di (20,7- 5,6 kPa) mentre quello diastolico (8,0- 2,0 kPa). I picchi della sollecitazione sistolica erano superiori a quelli riportati in tessuti cardiaci ingegnerizzati stimolati a 0.5 Hz a temperatura ambiente (9,2- 3,5 kPa), probabilmente poiché questi esperimenti sono stati condotti a temperature fisiologiche.

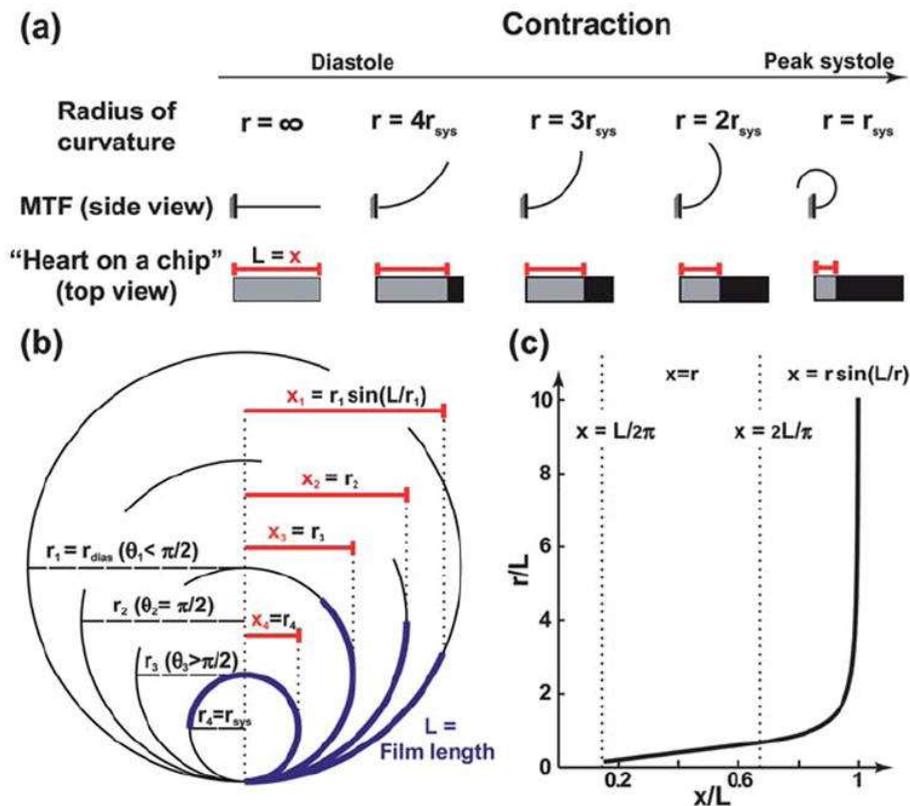


Figura 14 Calcolo del raggio di curvatura. (A) disegno schematico del "cuore su un chip", attraverso il ciclo di contrazione; (B) La proiezione x misurata durante l'esecuzione dell'esperimento al crescere del

raggio di curvatura; (C) Trama che mostra la relazione tra la proiezione x misurata e il raggio di curvatura, con equazioni appropriate da utilizzare in ciascuna regione. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4038963/figure/F2/>)

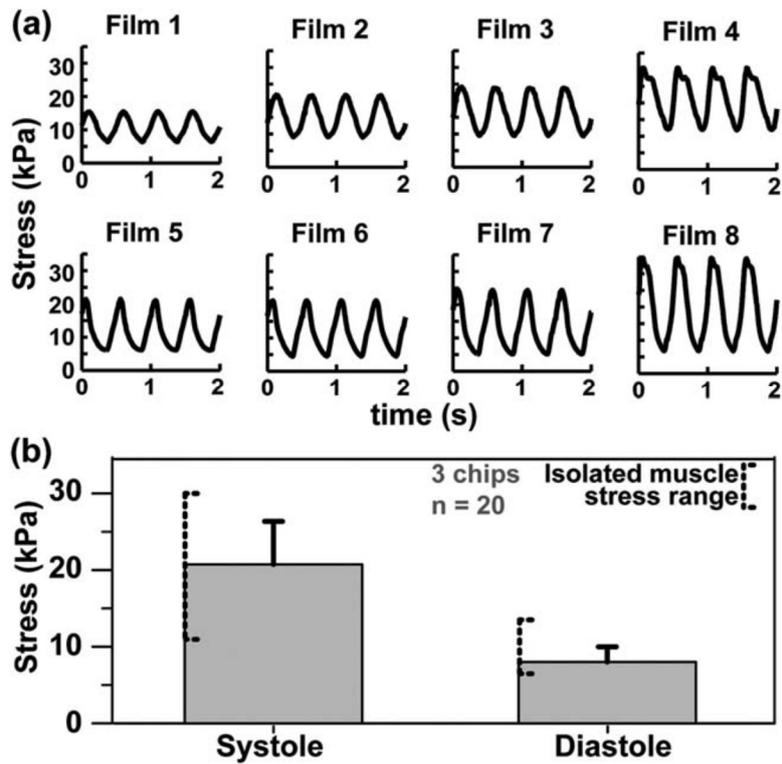


Figura 15 Contrazione cardiaca registrata con un heart on chip (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4038963/figure/F3/>)

3.3 Modello di una terapia cellulare cardiaca

Il trapianto di cellule staminali per migliorare la funzionalità cardiaca è sicuro ma poco promettente [20]. Studi preclinici hanno dimostrato che l'attecchimento delle cellule staminali nel miocardio ne diminuiscono la forza contrattile. Per riparare le proprietà contrattili del cuore, le forze meccaniche devono essere trasmesse attraverso tutto il cuore, dai miociti al miocardio. Ciò comporta la formazione dei dischi intercalari, giunzioni cellula-cellula specializzate che trasmettono segnali elettrochimici e forze meccaniche. Purtroppo, le forze di trazione fra miociti neoformati e miociti esistenti non possono essere misurate in vivo.

Si è ipotizzato che i nuovi miociti presentano una forza contrattile minore che limita la trasmissione dell'impulso contrattile nei miociti primari. Per verificare questa ipotesi, è stato sviluppato un test in vitro per studiare l'accoppiamento meccanico tra due microtessuti cellulari (figura 16). Sono stati usati miociti ventricolari di murino neonato e miociti derivati da cellule staminali embrionali immature (mES-CMs) o, miociti derivati da cellule staminali indotte pluripotenti di murino (miPS-CMs).

L'imaging raziometrico e la microscopia a forza di trazione (TFM) hanno rivelato contrazioni meccaniche tra le cellule e flussi contemporanei di Ca^{2+} , ma nelle due linee di cellule staminali questi due fenomeni avevano picchi inferiori. Queste differenze hanno prodotto uno squilibrio di tensione tra i microtessuti, provocando lo sviluppo di forze di trazione e la formazione di aderenze nel substrato vicino alla giunzione cellula-cellula. Un modello a elementi finiti che simula la contrazione muscolare ha rivelato che le differenze di tensione isometrica erano sufficienti per prevedere ciò che sarebbe accaduto nel substrato. Nonostante il raggiungimento di una contrazione sincrona, la ridotta trasmissione della forza tra i miociti già presenti e quelli di nuova formazione può limitare la riparazione della funzione contrattile in terapia cellulare cardiaca.

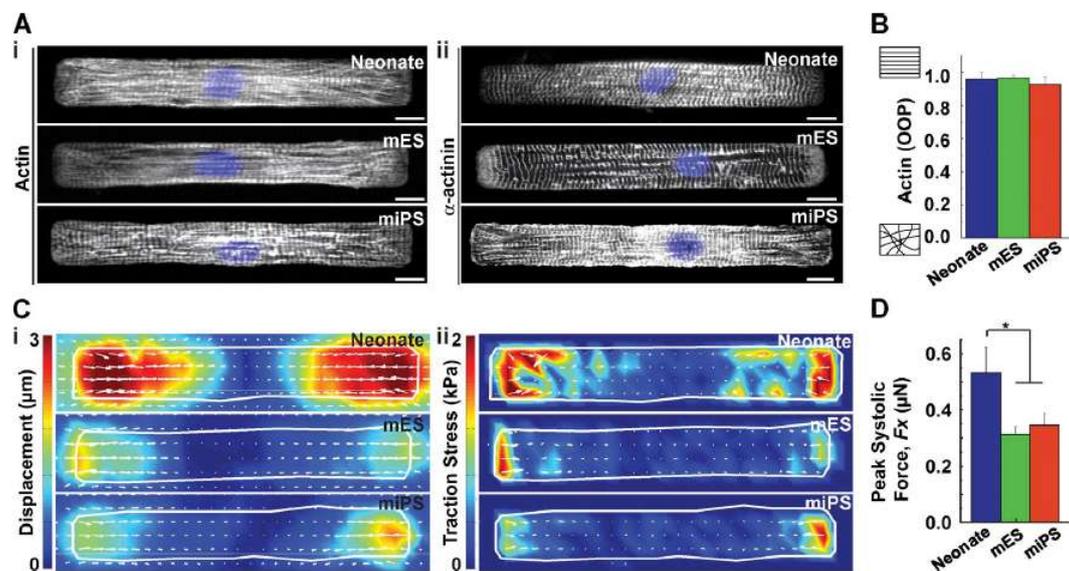


Figura 16 Cardiomiociti primari e derivati da cellule staminali. (A) Cellule mES o miPS-CMs colorate con actina (i) e (ii) α -actinina. (B) Actina OOP in funzione del tipo di cellula ($n = 25, 20, \text{ e } 9$ per neonato, mES, e miPS, rispettivamente). (C) mappe termiche che indicano lo spostamento del picco sistolico (i) e lo stress di trazione (ii). (D) Intensità del picco sistolico in funzione del tipo di cellula ($n = 8, 7, \text{ e } 7$ per il neonato, mES, e miPS, rispettivamente). (Disease Biophysics Group, Wyss Institute of Biologically Inspired Engineering, John A. Paulson School of Engineering and Applied Sciences, Harvard University, Cambridge, MA 02138)

3.3.1 La meccanotrasduzione

La piattaforma muscle-on-a-chip quantifica l'attecchimento strutturale e funzionale di miociti primari e dei neomiociti. Si è visto che:

- le cellule deboli mES o miPSCMs possono allineare le miofibrille, formare delle giunzioni, e contrarsi in modo sincrono con miociti neonati forti.
- I miociti derivati dalle cellule staminali mostrano flussi di calcio compromessi ed esercitano minore forza contrattile rispetto alle cellule primarie, con una conseguente formazione di aderenze nel substrato cellulare vicino alla giunzione.

I risultati in vitro e in silico suggeriscono che i miociti percepiscono lo squilibrio della forza attraverso la giunzione cellula-cellula e rispondono formando le aderenze nel substrato giunzionale che dissipano la forza in eccesso (figura 17). Sono necessari ulteriori studi per chiarire se queste aderenze partecipano alla segnalazione intracellulare. In mancanza di questo meccanismo meccanotrasduttivo, l'interfaccia cellula-cellula può essere distrutta meccanicamente, con la conseguenza di non rendere possibile la morfogenesi dei tessuti e il reclutamento di proteine per la formazione del disco intercalare. I risultati ottenuti per le cellule di ratto possono essere validi anche per le cellule umane nel contesto della terapia cellulare cardiaca, anche se non è stato possibile testarlo. Infatti, nonostante i numerosi tipi di cellule e i vari meccanismi di riparazione, i miociti di nuova formazione rimanevano sempre piccoli e mononucleati, caratterizzati da un'organizzazione immatura dei sarcomeri, dei mitocondri, e dei T-tubuli. Questo indica che nella realtà i miociti neofornati sono più deboli di quelli analizzati in vivo e, pertanto, possono essere soggetti al meccanismo di compensazione. In questo contesto, i dati suggeriscono che i miociti derivati dalle cellule staminali possono formare un sincizio con il miocardio nativo, questo può spiegare la riduzione dell'intensità dell'infarto riportata in molti studi. Allo stesso tempo, l'eterogeneità nelle proprietà di manipolazione e di generazione delle forze di calcio osservata tra miociti derivati e primari possono causare una insufficienza nella trasmissione della forza e causare aritmie che vanno a limitare il beneficio terapeutico. Si prevede un ampliamento della terapia cellulare cardiaca attraverso la piattaforma on chip per i test di screening, per identificare i tipi di cellule, per usi farmacologici e strategie di terapia genica attraverso l'accoppiamento meccanico tra miociti forti e deboli in vitro e attraverso l'attecchimento di miociti appena generati nel miocardio in vivo.

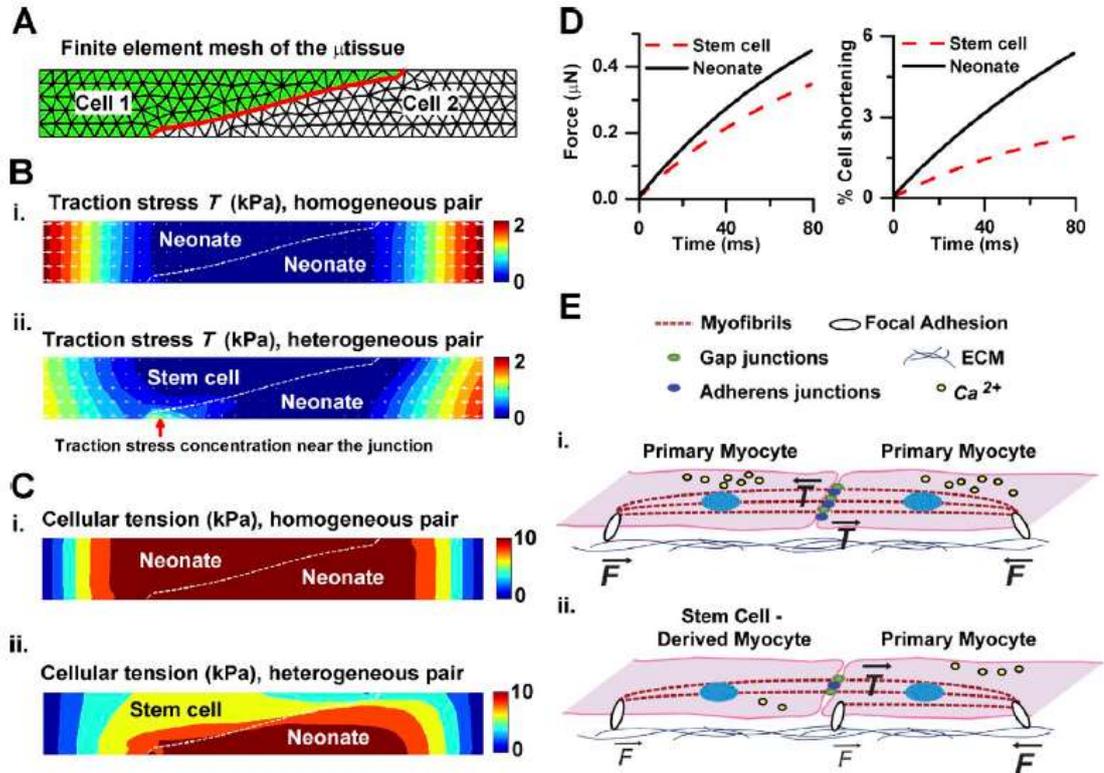


Figura 17 Modello della meccanica microtissutale. (A) Giunzione cellula-cellula evidenziata in rosso. (B e C) Pronostici dei modelli di trazione locale. (D) Riduzione della forza di trazione e percentuale di riduzione in due cellule eterogenee. (E) Illustrazione schematica che indica la tipica tensione sperimentata nelle aderenze nel substrato all'interno di coppie di cellule neonate (i) cellule eterogenee (ii) microtessuto. "Coupling primary and stem cell-derived cardiomyocytes in an in vitro model of cardiac cell therapy" (Disease Biophysics Group, Wyss Institute of Biologically Inspired Engineering, John A. Paulson School of Engineering and Applied Sciences, Harvard University, Cambridge, MA 02138)

3.4 Sindrome di Barth (BTHS)

La sindrome di Barth (BTHS) è un difetto congenito del metabolismo dei fosfolipidi con cardiomiopatia dilatativa (DCM), è una miopatia scheletrica, che causa neutropenia, ritardo della crescita e aciduria organica. La BTHS è dovuta alle mutazioni del gene TAZ (tafazzina; Xq28), che codifica per la Taz1p aciltransferasi coinvolta nel metabolismo della cardiolipina, un fosfolipide essenziale nelle membrane mitocondriali interne. Il deficit della funzione di Taz1p provoca anomalie nel rimodellamento della cardiolipina¹², che compromettono la funzione delle catene respiratorie e delle strutture mitocondriali. [21]

I meccanismi che conducono dalla biogenesi anormale della cardiolipina alla cardiomiopatia non sono ben compresi. Per analizzare la fisiopatologia della cardiomiopatia è stato necessario replicare la BTHS nei costrutti tissutali. Sono state combinate cellule iPSC (cellule staminali pluri indotte) derivanti dal paziente, RNA modificato (modRNA) e microchip bioingegnerizzati che simulano il tessuto miocardico (heart-on-chip). In questo modo sono state identificate le anomalie funzionali mitocondriali causate dalla mutazione TAZ e dalla carenza di cardiolipina. La mutazione di TAZ è necessaria e sufficiente per interrompere l'assemblaggio dei sarcomeri e la produzione di impulsi contrattili che quindi non sono dovute all'esaurimento globale di ATP.

Inoltre il fenotipo cardiomiopatico BTHS è facilmente reversibile con la reintroduzione di TAZ di tipo selvatico (WT) o con la soppressione di ossigeno reattivo (ROS), in eccesso, prodotto dai mitocondri BTHS. I risultati ottenuti forniscono nuovi approfondimenti sui collegamenti tra la funzione mitocondriale, l'assemblaggio dei sarcomeri e l'attività contrattile muscolare e suggeriscono nuove strategie terapeutiche per BTHS. [22]

¹² La cardiolipina è un lipide molto importante che costituisce una piccola parte delle molecole che si trovano sulla membrana interna dei mitocondri.

3.4.1 Modellizzazione della BHTS su Heart on chip

Per poter verificare l'efficacia del trattamento TAZ modRNA è stato creato un modello della patofisiologia e lo si è testato sull'heart-on-chip con lo scopo di misurare quantitativamente la contrattilità del tessuto miocardico affetto da BHTS. Sono stati generati cardiomiociti derivati dalle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC-CM) da due persone non correlate con BHTS. Due linee iPSC, BTH-H e BTH-C, sono state riprogrammate rispettivamente utilizzando approcci retrovirali o modRNA.

Le iPSC-CM selezionate sono state seminate su elastomeri sottili con un micro pattern caratterizzato da fibre di fibronectina e supportate da dei coprivetrini. Le cellule dopo 5 giorni di coltura si sono auto-organizzate in un miocardio anisotropo laminare.

Successivamente si è analizzata la colorazione della α -actina sarcomerica nel tessuto contenente le iPSC-CM sane e in quello BHTS ingegnerizzato.

I rettangoli di fibronectina con iPSC-CM sane avevano i sarcomeri allineati e le strutture fibrose indicative del fenotipo relativamente immaturo (figura 18a), il tessuto BHTS contenente iPSC-CM invece aveva un allineamento dei sarcomeri diverso (figura 19).

Tagliando un pezzo di film in PDMS, il tessuto muscolare coltivato inizia a contrarsi e a flettersi sul piano del coprivetrino. Calcolando il raggio di curvatura si misurano gli sforzi sistolici e diastolici (vedi paragrafo 3.2), lo sforzo di contrazione è stato calcolato come la differenza tra stress sistolico e diastolico (Fig. 18a).

Successivamente sono stati fatti alcuni esperimenti sui film (figura 18b):

- Applicando un campo elettrico, le iPSC-CM dei MTFs si sono contratte in modo ritmico a frequenze variabili da 1 a 5 Hz, i tessuti BTH-H iPSC-CM hanno subito stress significativamente più bassi e il picco dello stress sistolico confrontato in base alla gamma di frequenze di stimolazione, ricapitola il fenotipo miopatico BHTS.
- Il trattamento di BTH-H iPSC-CM con TAZ modRNA per 5 giorni ha restaurato la contrazione dei tessuti MTF a livelli comparabili a quelli di controllo, confermando che la cardiomiopatia è reversibile e dovuta alla mutazione TAZ.
- Si è valutato infine come l'ATP contribuisce alla disfunzione contrattile di BHTS coltivando le iPSC-CM MTF in terreni contenenti glucosio, si è visto che il glucosio da solo non ha ripristinato la contrazione ottimale dei tessuti MTF BTH-H iPSC-CM a qualsiasi frequenza di stimolazione esaminata.

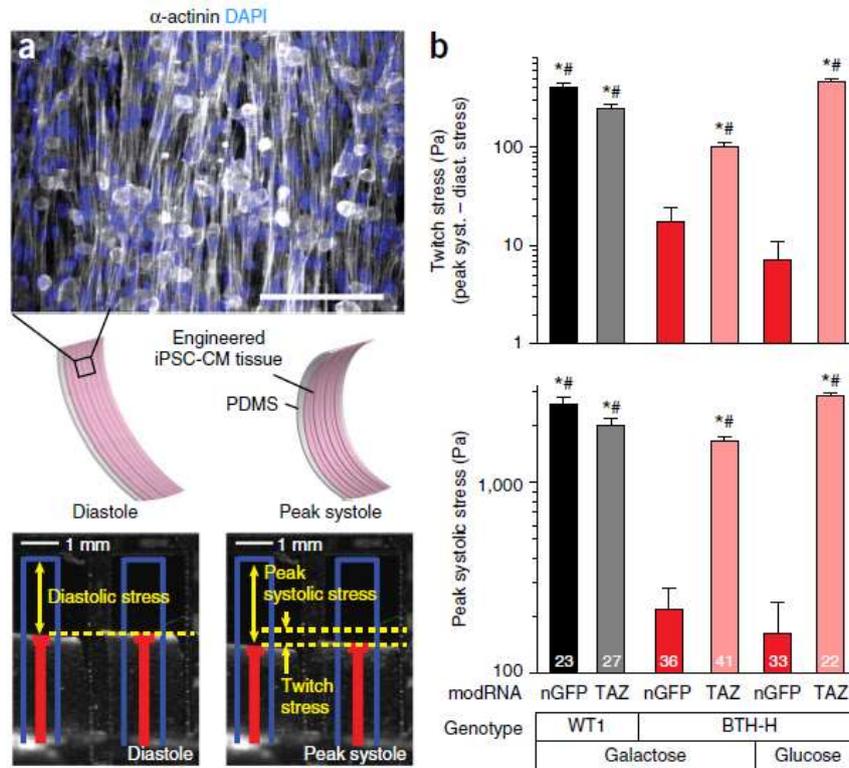


Figura 18 Tessuto miocardico BTBS che presenta una depressione di stress contrattile. (a) colorazione dell' α -actinina di un MTF (in alto), iPSC-CMs auto-organizzate in tessuti aniotropici del miocardio (in mezzo), immagini di MTF in diastole e sistole. Le righe rosse indicano il monitoraggio MTF automatico proiettato sul piano orizzontale. Le righe blu indicano lunghezze di MTF prima di tagliarle dal substrato in PDMS. (in basso). (b) Sforzo di torsione e picco sistolico generato da MTF a 2 Hz. MTFs sono stati generati da BTH-H e cellule sane di controllo (WT1), iPSC-CMs transfettate con il modRNA indicato in mezzo di coltura di galattosio o di glucosio.

(Nature Medicine, doi:10.1038/nm.3545)

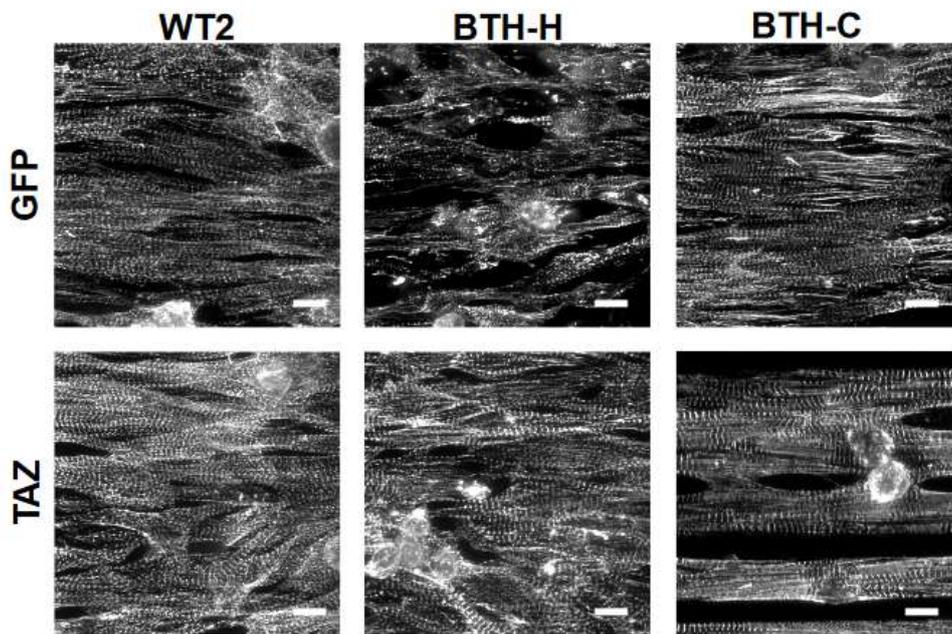


Figura 19 Tessuti del miocardio con IPSC-CM, organizzazione dei sarcomeri nel tessuto miocardico valutata con la colorazione di α -actinina. Bar = 10 μ m

(<https://www.nature.com/article-assets/npg/nm/journal/v20/n6/extref/nm.3545-S1.pdf>)

3.4.2 Valutazione di potenziali terapie utilizzando BTHS iPSC-CM

I BTHS iPSC-CM sono stati utilizzati per valutare l'effetto di tre potenziali terapie per BTHS:

- Bromofenolo Lattone: un inibitore della fosfolipasi mitocondriale A2, che catabolizza la cardiopilina matura
- Acido linoleico (LA), acido grasso insaturo essenziale da cui deriva la cardiopilina matura;
- Arginina più cisteina, aminoacidi che sono frequentemente carenti nei pazienti con BTHS.

Dei tre trattamenti sperimentati, l'acido linoleico LA è stato il più efficace nel correggere il fenotipo metabolico di BTHS iPSC-CM e nel sintetizzare la cardiopilina:

- ha migliorato l'organizzazione dei sarcomeri di BTH-H iPSC-CM, mentre non è stato osservato nessun miglioramento significativo nei BTH-C iPSC-CM, la cui organizzazione sarcomerica non era significativamente diversa da quella del campione di controllo.
- In entrambe le linee cellulari è aumentato drasticamente lo stress di torsione, arrivando a livelli quasi normali, diminuendo i deficit contrattili dei BTHS iPSC-CM.
- LA è un antiossidante in grado di sopprimere il ROS¹³ mitocondriale prodotto in grandi dosi nella BHTS.

L'analisi metabolica e funzionale dei cardiomiociti umani in BTHS ha evidenziato che la deplezione della cardiopilina matura provoca un deficit della funzionalità mitocondriale. I dati mostrano che il deficit contrattile di BTHS iPSC-CM non è dovuto all'esaurimento dell'energia cellulare, piuttosto, la carenza di TAZ in BTHS compromette l'assemblaggio di sarcomeri, la produzione di stress contrattile, causa una notevole crescita della produzione di ROS e che la soppressione della ROS normalizza i fenotipi metabolici, di sarcomerogenesi e contrattili di BTHS iPSC-CM.

Tuttavia siamo lontani dall'adottare le iPSC per i modelli delle malattie in ambito clinico e commerciale. Ciò è dovuto alla variazione genetica e epigenetica tra linee cellulari che

¹³ Sono molte le fonti che dicono che alti livelli di ROS causano insufficienza cardiaca, a causa degli effetti sulla distribuzione e funzione dei sarcomeri.

le IPSc causano, introducendo variabili difficili da controllare. La mancanza di modelli in vitro che riproducono la fisiopatologia della malattia rendono necessaria la convalida mediante modelli in vivo.

Conclusioni

In questo elaborato abbiamo evidenziato le grandi potenzialità di questa tecnologia, dalla replicazione dei meccanismi all'interno degli organi e dei tessuti, alla modellizzazione delle malattie, ad una sperimentazione farmaceutica senza l'uso degli animali [23].

La grande innovazione di questa tecnologia risiede nella capacità di progettare sistemi di coltura i cui parametri (ad esempio, tipi, posizioni delle cellule) possono essere variati in modo indipendente, allo stesso tempo è possibile avere in tempo reale un imaging ad alta risoluzione degli eventi a livello tissutale o dell'organo. Questo rende possibile replicare unità funzionali diverse degli organi (ad esempio il cuore vs polmone) e analizzare il loro comportamento, ciascuno nel proprio circuito integrato. Rispetto ai sistemi di coltura in macroscale infatti negli organs on chip le cellule dei tessuti vengono impiantate in modo preciso e coerente permettendo l'uso della microscopia confocale, della microfluorimetria, delle misure TEER, e di altre misurazioni analitiche.

Importante è anche la possibilità di controllare il flusso del fluido che porta ad una migliore differenziazione e ad una longeva sopravvivenza delle cellule; seguendo questo percorso sarebbe possibile effettuare studi di rilievo per le patologie croniche che non si manifestano immediatamente. La possibilità di controllare il flusso del fluido consente di verificare che siano rispettate le proprietà ADMET, prevedendo in modo migliore rispetto alle colture statiche le proprietà PK / PD dei farmaci.

Tuttavia, siamo ancora agli inizi e questa tecnologia, presenta ampi margini di miglioramento. Dal punto di vista tecnico si rilevano le seguenti criticità:

- nei canali microfluidici possono formarsi delle bolle, non rimuovibili completamente, che vanno a danneggiare le cellule e ad ostacolare il processo di controllo durante la fabbricazione del chip.
- nonostante il chip sia continuamente perfuso così da permettere alle cellule di vivere a lungo, l'uso del gel ECM¹⁴ (from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma) come rivestimento può creare una degradazione della matrice e una sua contrazione nel tempo, poiché ha proprietà meccaniche e strutturali diverse da quelle della membrana extracellulare naturale.

¹⁴ <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/3/e1270dat.pdf>

- i chip non sono abbastanza robusti da prevenire la contaminazione microbica e da controllare le interazioni cellula-cellula e cellula-ECM necessarie per generare l'esatta relazione struttura/funzione che invece esercita il tessuto.
- sebbene il PDMS sia un materiale dalle ottime proprietà, per la replicazione della funzionalità organica non è completamente adeguato allo scopo: riesce ad assorbire i piccoli composti organici, tra cui molti farmaci e la sua elevata permeabilità ai gas può ostacolare alcune applicazioni. Si sta pensando di fabbricare i circuiti integrati in poliuretano, un altro polimero, simile al PDMS, che ha i suoi stessi vantaggi ma non assorbe piccole quantità di farmaci. È necessario inoltre che il materiale sia a basso costo per permettere una ingente produzione di organs on chip.

Purtroppo con questa architettura su micro scala non si è riuscito a replicare le funzioni che agiscono su più livelli come la funzione meccanica delle ossa, come agiscono i legamenti e i tendini, come il cervello realizza la cognizione; e fino ad ora non è stato possibile riprodurre l'eterogeneità spaziale presente in sezioni di tessuto, (ad esempio, nel polmone, la struttura epiteliale varia passando dalla trachea ai bronchi alle vie respiratorie alveolari).

Qual è il futuro di questa tecnologia?

Nel campo della ricerca accademica l'uso e la funzionalità di questa tecnologia è sorprendente e rivoluzionaria. Tuttavia dal punto di vista operativo e commerciale questa tecnologia non è largamente diffusa. Il rischio è, di aver riposto troppe aspettative rispetto allo scenario attuale. Quella degli organs on chip è una nuova tecnologia e sarà necessario molto tempo e lavoro prima che le aspettative siano realizzate. Bisogna essere pragmatici e vedere la realtà per quella che è, rispetto agli altri modelli di analisi cellulare questo sembra essere il più realistico ma non replica gli esperimenti animali o l'abilità di studiare un intero organo. I modelli su chip rispondono ai farmaci come lo fa un organo umano, per esempio si può vedere che il battito del cuore aumenta dopo una dose di adrenalina, o che i globuli bianchi fagocitano i batteri attivando la risposta immunitaria dell'organismo; tali test però non riescono a replicare in toto la complessità dell'organo, i chip falliscono nel replicare risposte governate da segnali complessi provenienti dal sistema endocrino o immunitario. Un farmaco agisce su più organi, ma fino ad ora se si testa il farmaco su più chip collegati la sperimentazione fallisce perché non si sa

esattamente cosa cercare, ad esempio è provato che il paracetamolo è tossico per il fegato ma non si sa che effetto abbia sugli altri organi.

Per ora questa tecnologia è un ottimo strumento di screening che fornisce indicazioni migliori sul successo terapeutico rispetto all'analisi delle semplici colture cellulari. Si spera che le ricerche in questo campo progrediscano portando i risultati attesi, rendendo operativa questa tecnologia rivoluzionaria ad un basso costo, con la possibilità di effettuare molti screening in parallelo e di semplice utilizzo.

Bibliografia

- [1] Treccani, Enciclopedia della Scienza e della Tecnica (2007), Modelli sperimentali nella ricerca biomedica
- [2] Zanichelli (2010), Sperimentazione sugli animali o in vitro?
- [3] Sistemi Micro e Nano elettronici: Principi e applicazioni della microfluidica. Appunti dalle lezioni del corso. Ing. Caterina Ciminelli: “ftp://ftpdee.poliba.it/Opto/Sistemi%20Micro%20e%20Nanoelettronici/AA%202009_2010-2014_2015/A.A.%202010-2011/Capitolo3_b%20PRINCIPI%20E%20APPLICAZIONI%20DELLA%20%20%20%20%20%20MICROFLUIDICA.pdf”
- [4] Tesi di Laurea: Microfluidica di solventi organici in dispositivi polimerici funzionali: “http://www.dmf.unisalento.it/studenti/tesi/fisica/tesi_francesca_pietracaprina.pdf”
- [5] Dongeun Huh, Geraldine A. Hamilton and Donald E. Ingber, From 3D cell culture to organs-on-chips, Trends in Cell Biology December 2011, Vol. 21, No. 12
- [6] Ravi S. Kane, Shuichi Takayama, Emanuele Ostuni, Donald E. Ingber, George M. Whitesides Patterning proteins and cells using soft lithography, Biomaterials 20 (1999) 2363-2376
- [7] Eric W. Esch, Anthony Bahinski, and Dongeun Huh, Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery, Nat Rev Drug Discov. 2015 Apr; 14(4): 248–260.
- [8] Microfluidica: Teoria ed Applicazioni F. Menolascina and C. Ciminelli: ftp://ftp-dee.poliba.it/Opto/Sistemi%20Micro%20e%20Nanoelettronici/AA%202009_2010-2014_2015/appunti_microfluidica.pdf
- [9] Kuncova-Kallio, Johana; Kallio, Pasi 2006. PDMS and its suitability for analytical microfluidic devices. 28th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 30 August - 3 September, 2006, New York, NY, USA 2486- 2489
- [10] Shuichi Takayama, Emanuele Ostuni, Xiangping Qian, J. Cooper McDonald, Xingyu Jiang, Phil LeDuc, Ming-Hsien Wu, Donald E. Ingber, and George M. Whitesides, “Topographical Micropatterning of Poly(dimethylsiloxane) Using Laminar Flows of Liquids in Capillaries”, Adv. Mater. 13, 570 (2001).
- [11] S. R. Khetani and S. N. Bhatia, “Microscale culture of human liver cells for drug development,” Nat. Biotechnol., vol. 26, pp. 120–126, Jan. 2008.

- [12] Sn Bhatia, DE Ingber, Microfluidic organs-on-chips, *Nature* (2014), Hyun Jung Kim, Hu Lia, James J. Collins, and Donald E. Ingber
- [13] Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip”, January 5, 2016 vol. 113 no. 1, doi: 10.1073/pnas.1522193112
- [14] Kyung-Jin Jang,^a Ali Poyan Mehr,^{ab} Geraldine A. Hamilton,^a Lori A. McPartlin,^a Seyoon Chung,^{ac} Kahp-Yang Suhd and Donald E. Ingber, “Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment”, *Integr. Biol.*, 2013, 5, 1119
- [15] <https://www.utwente.nl/ewi/bios/research/biomedical/bbb/>
- [16] Torisawa YS, et al. Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology in vitro. *Nature Methods*. 2014; 11:663–669. [PubMed: 24793454]
- [17] Pasqualini FS, Emmert MY, Parker KK, Hoerstrup SP. Organ Chips: Quality Assurance Systems in Regenerative Medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2016 Oct 6. doi: 10.1002/cpt.527
- [18] Johan U. Lind, Travis A. Busbee, Alexander D. Valentine, Francesco S. Pasqualini, Hongyan Yuan, Moran Yadid, Sung-Jin Park, Arda Kotikian, Alexander P. Nesmith, Patrick H. Campbell, Joost J. Vlassak, Jennifer A. Lewis and Kevin K. Parker, Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing, 24 October 2016, DOI: 10.1038/NMAT4782
- [19] Grosberg, A., Alford, P.W., McCain, M.L. & Parker, K.K. Ensembles of engineered cardiac tissues for physiological and pharmacological study: heart on a chip, *Lab Chip* 11, 4165–4173 (2011).
- [20] Yvonne Aratyn-Schaus, Francesco S. Pasqualini, Hongyan Yuan, Megan L. McCain, George J.C. Ye, Sean P. Sheehy, Patrick H. Campbell, and Kevin Kit Parker J., Coupling primary and stem cell–derived cardiomyocytes in an in vitro model of cardiac cell therapy, *Cell Biol*. Vol. 212 No. 4 389–397, www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201508026
- [21] http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=IT&Expert=111
- [22] Gang Wang, Megan L McCain, Luhan Yang, Aibin He¹, Francesco Silvio Pasqualini, Ashutosh Agarwal, Hongyan Yuan, Dawei Jiang, Donghui Zhang, Lior Zangi, Judith Geva¹, Amy E Roberts, Qing Ma, Jian Ding, Jinghai Chen, Da-Zhi Wang, Kai Li,

Jiwu Wang, Ronald J A Wanders, Wim Kulik, Frédéric M Vaz, Michael A Laflamme, Charles E Murry, Kenneth R Chien, Richard I Kelley, George M Church, Kevin Kit Parker & William T Pu, Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies, doi:10.1038/nm.3545
[23] Esch, E.W., Bahinski, A. & Huh, D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 248-260 (2015)