



RIASSUNTO

SVILUPPO DI DISPOSITIVI MICROFLUIDICI PER APPLICAZIONI BIOMEDICHE DELLA MICROSPETTROSCOPIA INFRAROSSA CON RADIAZIONE DI SINCROTRONE

di Birarda Giovanni

L'identificazione e la quantificazione di processi biologici in un complesso sistema vivente può essere ritenuta una disciplina al confine tra la Fisica, la Biologia e l'Ingegneria, con importanti sfide scientifiche, innovazioni tecnologiche e un grande impatto sulla dissezione di fenomeni a livello tissutale, cellulare e sub cellulare.

Il presente lavoro di Dottorato ha avuto come obiettivo lo sviluppo di metodologie e tecnologie atte a rendere la MicroSpettroscopia InfraRossa (MSIR) una tecnica matura allo studio in tempo reale di fenomeni biologici, permettendo di effettuare esperimenti *"in vitro"* in condizioni fisiologiche.

Questo obiettivo è stato raggiunto tramite l'utilizzo delle tecniche di microfabbricazione per la realizzazione di un *"Lab-on-Chip"* (LOC) trasparente sia nella regione dell'infrarosso che nel visibile, tramite il quale misurare cellule vive. Infatti fin'ora la MISR è stata impiegata quasi esclusivamente per lo studio di campioni di tessuti o di cellule fissati, permettendo di registrare solo *"singoli fotogrammi"* dei fenomeni sotto indagine. La ragione di questa limitazione è da imputarsi alle difficoltà spettroscopiche che si incontrano nell'investigazione di sistemi acquosi e ai limiti di fabbricazione dei più comuni materiali IR trasparenti, che hanno limitato la flessibilità di design necessaria alla realizzazione di LOC adatti alle analisi tramite MSIR.

Siamo riusciti a superare la cosiddetta "barriera di assorbimento dell'acqua" tramite l'estensione dei concetti della microfluidica e dellamicrofabbricazione al calcio fluoruro, implementando soluzioni fabbricative che hanno permesso lo studio tramite MSIR di cellule viventi sottoposte a differenti stimoli sia di natura chimica che fisica. Grazie all'alta brillantezza della Radiazione di Sinctrotrone (SR) IR, che permette il campionamento con una risoluzione spaziale al limte di diffrazione, abbiamo dimostrato la fattibilità dell'individuazione dei processi intra cellulari. Contemporaneamente sono state sviluppate nuove strategie per l'acquisizione dei dati e per la loro analisi, permettendo il design di esperimenti innovativi.



I nostri studi si sono concentrati sullo studio del sistema immunitario, in particolare nella valutazione della risposta biochimica caratteristica dei leucociti circolanti durante la loro deformazione, sia indotta da cause di tipo puramente meccanico, sia in risposta a gradienti chimici. Grazie alla microfabbricazione, siamo stati capaci di simulare il microambiente cellulare sia per lo studio dei globuli bianchi durante la circolazione microcapillare sia durante l'extravasazione indotta da gradienti chimici.

La presente Tesi dimostra che la sinergia dei “*micro*” approcci, o piuttosto la combinazione di microfabbricazione e microspettroscopia IR, può essere usata per estendere le frontiere della MSIR a nuovi campi nello studio delle scienze della vita. Attraverso il preciso controllo del microambiente cellulare, cruciale per un'accurata analisi dei dati e fondamentale per l'attendibilità delle conclusioni biologiche, si possono chiarire fenomeni finora mai investigati tramite MSIR, come la mecano-biologia che abbiamo esplorato direttamente, abbattendo la barriera dell'acqua.