

La sfida: isolare cellule rare

Grazie a National Instruments è stato possibile progettare, sviluppare e produrre uno strumento capace di individuare e isolare cellule tumorali circolanti (CTC) con lo scopo di studiare cure personalizzate in campo oncologico o cellule fetali nel sangue materno, per consentire una diagnosi prenatale non invasiva

Si Silicon Biosystems ha sviluppato una tecnologia proprietaria 'lab-on-chip' che sfrutta le potenzialità microelettroniche di un substrato attivo di silicio e realizza, di fatto, un laboratorio biologico miniaturizzato capace di manipolare individualmente cellule in sospensione. Il 'lab-on-chip' di Silicon Biosystems è governato da un controllore embedded di National Instruments. Questo laboratorio si chiama DEPArray ed è una piattaforma tecnologica ba-

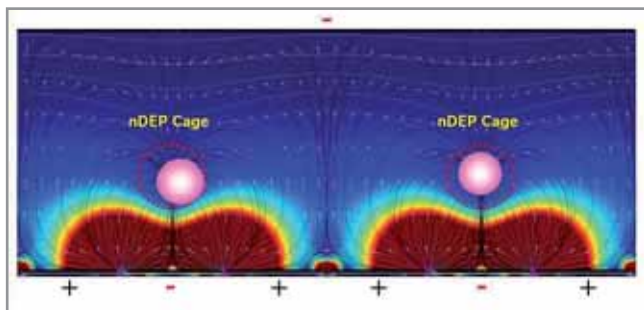


Fig. 1 - Intrappolamento delle cellule attraverso le gabbie DEP

sata sul principio fisico della dielettroforesi. Il cuore del sistema è costituito da un microchip che integra un array di 300.000 elettrodi in un circuito microfluidico. Quando una sospensione di cellule viene iniettata attraverso il sistema di canali, le singole cellule vengono ingabbiate in corrispondenza dell'array in levitazione stabile, senza mai toccare il substrato. Le cellule vengono quindi analizzate in fluorescenza e in campo chiaro, selezionate in funzione di specifici criteri di gating e successivamente analizzate sulla base delle proprietà morfologiche prima della selezione finale. Le cellule selezionate vengono movimentate singolarmente mediante campi elettrici attraverso un controllo software sviluppato in LabView ed eventualmente recuperate per l'analisi genetica.

La tecnologia in campo

La tecnologia di Silicon Biosystems si basa sulla capacità di un campo elettrico di esercitare forze su particelle neutre polarizzabili (per esempio le cellule) sospese in un liquido. In accordo con questo principio elettrocinetico, che è chiamato dielettroforesi (DEP), una particella neutra, quando è soggetta a campi elettrici non uniformi, subisce una forza diretta verso posizioni dello spa-

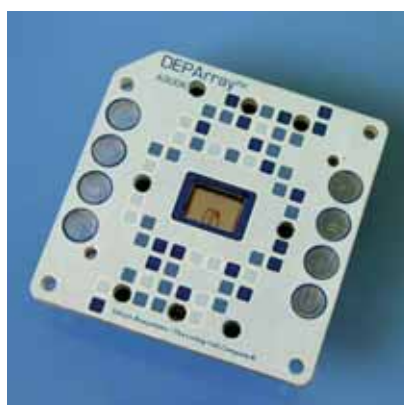


Fig. 2a - Il microchip DEPArrayTM

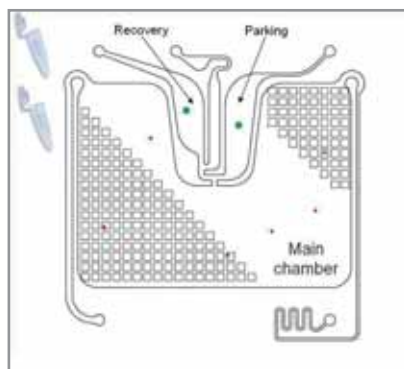


Fig. 2b - Layout del chip di DEPArray

zio con intensità di campo crescente (dielettroforesi positiva - pDEP) o decrescente (dielettroforesi negativa - nDEP). Più in particolare, una particella può essere soggetta a una forza pDEP oppure nDEP in funzione delle sue proprietà elettriche (dipendenti dalla frequenza) e di quelle del mezzo in cui si trova in sospensione (figura 1). Nel sistema DEPArray il campo elettrico è generato sulla superficie di un chip di silicio (figura 2a) direttamente interfacciato a una camera microfluidica contenente la sospensione di cellule. Tale camera fluidica è confinata tra la superficie del chip e un coperchio trasparente conduttivo distanziato poche decine di micrometri dal chip. La superficie del chip attivo implementa un array bidimensionale di micro locazioni, ciascuna costituita da un elettrodo planare e circuiti logici integrati (figura 2b). Ciascun elettrodo può essere programmato per realizzare una buca di potenziale (ovvero una gabbia di dielettroforesi) posizionata nella regione dello spazio corrispondente all'elettrodo; all'interno di ciascuna di tali gabbie di dielettroforesi una particella può essere intrappolata in levitazione stabile per poi essere analizzata individualmente. L'analisi condotta su ciascuna cellula consente al sistema di effettuare sofisticate analisi basate sulle immagini in fluorescenza grazie alle quali è possibile identificare le carat-

teristiche peculiari che distinguono una cellula target da decine di migliaia di altre cellule contaminanti. Passo dopo passo le cellule target possono essere movimentate in modo indipendente ma simultaneamente verso una zona del chip da cui possono essere recuperate in modo automatico mediante controllo microfluidico.

Un sistema tecnologicamente avanzato

La piattaforma proprietaria di Silicon Biosystems, DEPArray, è un sistema tecnologicamente avanzato, flessibile e di facile utilizzo (figura 3). DEPArray gestisce meccanica di alta precisione, microfluidica, strumentazione elettronica Cots e custom, visione e image-processing permettendo all'utente di eseguire il workflow riassunto dai seguenti step fondamentali: caricamento del campione mediante controllo microfluidico; acquisizione di im-



Fig. 3 - La macchina da laboratorio

magini in campo visibile e fluorescenza e analisi delle immagini; identificazione e selezione delle cellule target mediante interfaccia grafica utente; sorting automatico delle cellule target identificate; recupero delle cellule target con controllo microfluidico. Tutti questi step sono possibili grazie all'utilizzo di tecnologie (hardware e/o software) di National Instruments. Il caricamento del campione è un processo particolarmente delicato. LabView controlla il gruppo pompe per creare all'interno della camera microfluidica i gradienti di pressione necessari a far fluire il campione dal serbatoio di ingresso all'interno del chip. Il processo di caricamento viene monitorato e controllato automaticamente dal sistema utilizzando algoritmi implementati con le librerie di visione Vision Development Module. Una volta che il campione è stato caricato sul chip, LabView controlla tutte le linee I/O che servono per creare la configurazione dell'array di elettrodi del chip al fine di ingabbiare le cellule e tenerle in sospensione durante tutte le fasi del processo garantendo un controllo robusto e affidabile del sistema. L'analisi del campione è ottenuta attraverso la scansione ottica dell'intera superficie del chip con molteplici filtri in fluorescenza oltre che in campo chiaro: LabView controlla il sistema di movimentazione su cui è alloggiato il chip con precisione micrometrica e gestisce il processo di acquisizione, di image processing e di visualizzazione (Vision Development Module) delle immagini digitali ad alta risoluzione provenienti dal microscopio.

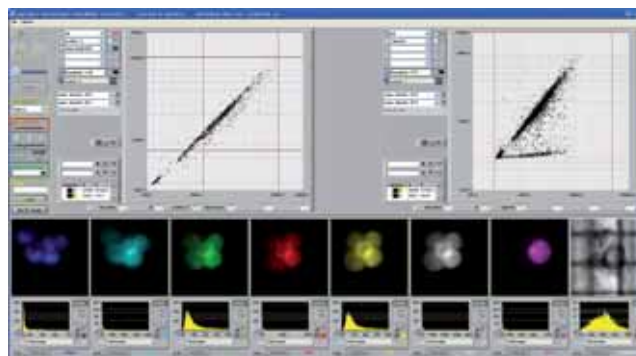


Fig. 4 - Interfaccia grafica per l'analisi delle cellule

I vari step

Nello step della selezione, DEPArray mette a disposizione dell'utente una potente interfaccia uomo-macchina (HMI) sviluppata in LabView integrato con il Framework .NET per la classificazione e la selezione delle cellule target (figura 4). Le cellule possono essere analizzate sotto diversi aspetti per validarne la loro natura. L'HMI visualizza scatter plot o istogrammi delle misure effettuate durante lo step di analisi e fornisce una rappresentazione in forma di tabella di tutte le misure effettuate sulle immagini. Per ogni cellula selezionata viene inoltre mostrata la galleria delle immagini acquisite durante lo step di analisi per consentire all'utente di integrare le misure effettuate dal calcolatore con una valutazione morfologica. Nello step del sorting automatico, in funzione della mappa delle cellule e di quella degli ostacoli, LabView crea dinamicamente la configurazione dell'array di elettrodi del chip capace di far muovere ciascuna cellula di interesse individualmente e simultaneamente dalla posizione iniziale sino al punto di recupero. Il controllo digitale della movimentazione eseguito su ciascuna delle cellule di interesse consente al sistema di ottenere una purezza di sorting elevata raggiungendo prestazioni incomparabili. Nello step del recupero LabView interagisce con il gruppo di pompe peristaltiche per creare all'interno della microcamera di recupero del chip il gradiente di pressione necessario a far defluire la porzione di buffer contenente la o le cellule selezionate sul supporto di recupero (per esempio un pozzetto o un vetrino). Il processo di sorting e di recupero può essere iterato consentendo la raccolta separata di molteplici cellule o gruppi di cellule purificate che saranno poi destinate all'analisi genetica eseguita tramite tecniche tradizionali di biologia molecolare.

Conclusioni

La tecnologia sviluppata da Silicon Biosystems, sfruttando le piattaforme hardware e software di National Instruments e le competenze nell'utilizzo di tali strumenti da parte di Sky Technology, apre la strada a una serie di attività di ricerca di elevato interesse, che mirano all'isolamento di cellule tumorali circolanti con lo scopo di studiare cure personalizzate in campo oncologico e all'individuazione di cellule fetali nel sangue materno, per consentire una diagnosi prenatale non invasiva.

Nota: gli autori appartengono alle aziende Silicon Biosystems(*) e Sky Technology(**)

National Instruments