

POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



**MODELLO REOLOGICO DEL MOTO DEGLI
ERITROCITI IN MICROCANALI PER
OTTIMIZZARE L'INCAPSULAMENTO DI
MOLECOLE PROBANTI**

Relatore: Prof.ssa Maria Laura COSTANTINO
Correlatore: Dott. Ing. Giustina CASAGRANDE

Tesi di Laurea di:
Davide CORTINOVIS
Matricola 755219

Anno accademico 2012-2013

INDICE

Sommario.....	1
Summary.....	5
1. Introduzione.....	10
2. Il sangue.....	12
2.1 Il plasma.....	12
2.2 Globuli bianchi.....	13
2.3 Piastrine.....	14
2.4 Globuli rossi.....	14
2.4.1 <i>Trasformazioni morfologiche</i>	15
2.4.2 <i>Stroma</i>	17
2.4.3 <i>Proprietà meccaniche dello stroma</i>	18
2.5 Emolisi.....	23
2.5.1 <i>Emolisi meccanica</i>	24
2.5.2 <i>Meccanismi di emolisi meccanica in un tubo</i>	26
2.5.3 <i>Invecchiamento cellulare</i>	27
2.6 Danno sub-emolitico.....	27
2.7 Reologia del sangue.....	32
2.7.1 <i>Densità</i>	32
2.7.2 <i>Viscosità</i>	33
2.8 La microcircolazione.....	40
2.8.1 <i>Effetto Fahraeus-Lindqvist</i>	41
2.8.2 <i>Effetto Fahraeus</i>	42
2.8.3 <i>Cell-depletion layer</i>	44
3. Tecniche d'incapsulamento.....	47
3.1 Introduzione.....	47
3.2 Incapsulamento in globuli rossi.....	48
3.3 Tecniche d'incapsulamento tradizionali.....	49
3.3.1 <i>Elettroporazione</i>	50

3.3.2	<i>Endocitosi indotta farmacologicamente</i>	51
3.3.3	<i>Metodi basati su processi osmotici</i>	52
3.3.3.1	<i>Metodo dell'impulso osmotico</i>	52
3.3.3.2	<i>Emolisi ipotonica</i>	53
3.4	<i>Incapsulamento mediante sforzi di taglio</i>	57
3.5	<i>Applicazioni terapeutiche</i>	58
4.	Modello computazionale	61
4.1	<i>Introduzione</i>	61
4.2	<i>Geometria</i>	62
4.3	<i>Materiali</i>	64
4.4	<i>Mixture Model</i>	64
4.4.1	<i>Equazioni</i>	65
4.4.2	<i>Condizioni iniziali</i>	67
4.4.3	<i>Condizioni al contorno</i>	69
4.4.4	<i>Gravità</i>	70
4.4.5	<i>Discretizzazione</i>	70
4.4.6	<i>Slip velocity model</i>	71
4.4.7	<i>Mixture viscosity model</i>	72
4.4.8	<i>Fase continua e fase dispersa</i>	73
4.5	<i>Laminar Flow Model</i>	74
4.5.1	<i>Equazioni</i>	74
4.5.2	<i>Condizioni iniziali</i>	75
4.5.3	<i>Condizioni al contorno</i>	76
4.5.4	<i>Discretizzazione</i>	77
4.5.5	<i>Proprietà del fluido</i>	77
4.6	<i>Particle Tracing for Fluid Flow Model</i>	78
4.6.1	<i>Equazioni</i>	78
4.6.2	<i>Condizioni al contorno</i>	80
4.6.3	<i>Proprietà delle particelle</i>	81
4.7	<i>Mesh</i>	81
4.8	<i>Tempo di diffusione</i>	82
4.9	<i>Distanza di diffusione</i>	83
4.10	<i>Applicazione dei modelli fluidodinamici</i>	85

5. Risultati	87
5.1 Analisi di sensitività della mesh.....	87
5.2 Analisi preliminare e confronto con letteratura.....	90
5.2.1 <i>Velocità</i>	90
5.2.2 <i>Shear Stress</i>	93
5.3 Prove di ottimizzazione.....	95
5.4 Indice di efficacia.....	103
6. Discussione	106
6.1 Analisi preliminare e confronto con letteratura.....	106
6.2 Prove di ottimizzazione.....	108
6.3 Indice di efficacia.....	113
6.4 Limiti dei modelli.....	115
7. Conclusioni	118
Bibliografia.....	120

SOMMARIO

La facilità con cui i globuli rossi riescono a raggiungere tutti i distretti del corpo umano ha portato a pensare queste cellule come potenziali trasportatori di farmaci. L'elevato numero di eritrociti presenti nel sangue e la capacità di mascherare il contenuto citoplasmatico hanno accresciuto l'interesse nei loro confronti e l'idea che potessero essere impiegati per il rilascio controllato di sostanze. A tal proposito, nel corso degli ultimi decenni, numerosi studi hanno dimostrato la possibilità di incapsulare molecole all'interno dei globuli rossi. Sollecitazioni di tipo fisico, chimico o meccanico, sono in grado di causare l'apertura temporanea di pori sulla membrana cellulare. In presenza di una differenza di concentrazione delle sostanze a cavallo dello stroma, si innesca un meccanismo di diffusione passiva che consente la migrazione da e verso la cellula. Terminata la sollecitazione, i pori si richiudono e le molecole contenute all'interno rimangono intrappolate finché non avviene l'emolisi cellulare. La rottura della membrana può avvenire in modo naturale o essere indotta da stimoli esterni.

Studi recenti hanno dimostrato la possibilità d'incapsulare molecole in eritrociti sollecitati dagli sforzi di taglio che nascono all'interno di un fluido in movimento. In particolare, lo studio preso come riferimento iniziale applicava questa procedura utilizzando canali di dimensioni micrometriche. Al fine di comprendere meglio la fluidodinamica all'interno di questi capillari e di ottimizzare il processo d'incapsulamento è stata effettuata un'analisi di tipo computazionale.

Utilizzando il software COMSOL Multiphysics 4.2a (COMSOL AB, Stockholm, Sweden), sono stati riprodotti la geometria del capillare ($46.79 \times 64.73 \mu\text{m}$ e lunghezza pari a 58.5 mm), il fluido di lavoro (una sospensione di globuli rossi in PBS) e sono stati impostati i valori di portata ed ematocrito usati nelle prove sperimentali ($Q = 0.25$ e $0.50 \mu\text{l/min}$; $H_T = 0.01$ e 0.05).

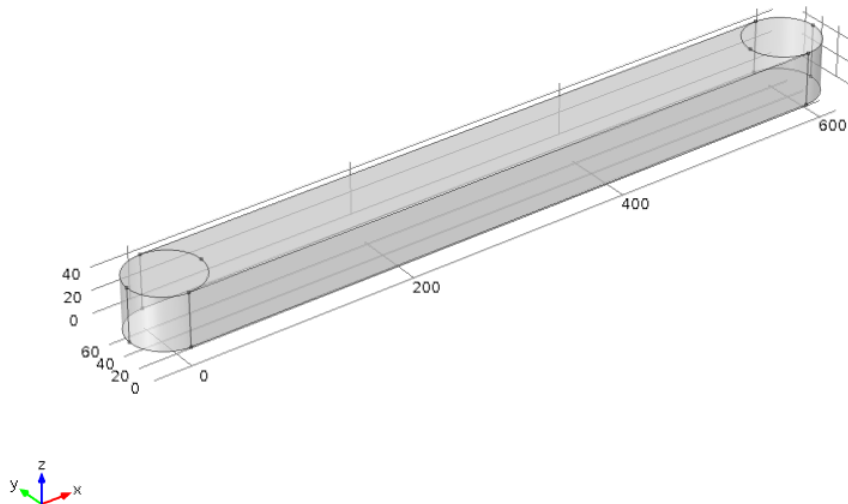


Fig. 1 Modello geometrico del capillare (per rendere comprensibile la geometria del condotto la lunghezza è stata ridotta di 100 volte rispetto al valore reale)

Il modello di flusso ritenuto più opportuno per ricavare le principali grandezze d'interesse come il profilo di velocità, la frazione in volume della fase dispersa e lo shear stress è il "Mixture Model". Questo modello consente di riprodurre il comportamento di miscele caratterizzate da particelle rigide e sferiche immerse in un liquido. Non consente però la visualizzazione delle particelle e della loro traiettoria. Per questo motivo si utilizza un secondo modello caratterizzato dall'accoppiamento del "Laminar Flow Model" con il "Particle Tracing for Fluid Flow Model": il primo fornisce, come input al secondo, tutte le caratteristiche del flusso di solo PBS nel condotto. Sulla base di questo il "particle model" introduce le particelle e ne definisce la traiettoria.

È stata scelta una mesh caratterizzata da elementi tetraedrici le cui dimensioni sono state definite dopo un'analisi di sensitività.

I valori della velocità massima e degli sforzi di taglio massimi ricavati sperimentalmente sono stati confrontati con quelli ottenuti tramite simulazioni numeriche. Le evidenti differenze tra i valori di queste grandezze sono imputabili ad un'approssimazione non del tutto corretta del profilo di velocità sperimentale.

Utilizzando gli stessi modelli e la stessa tipologia di mesh, ma modificando la dimensione della geometria del capillare ($50 \times 50 \mu\text{m}$ e lunghezza pari a 58.5 mm), sono state eseguite prove di ottimizzazione. L'obiettivo è quello di ricercare le condizioni fluidodinamiche più adatte tali da favorire il processo d'incapsulamento. Si ritiene che questo avvenga quando le coppie di valori τ - t (sforzo tangenziale medio - tempo di sollecitazione medio) si posizionano in prossimità della retta di Tillman. Per questo motivo si individua la portata opportuna tale da garantire da una parte valori adeguati di sforzi di taglio, dall'altra tempi di passaggio del globulo nel capillare maggiori del tempo necessario affinché la molecola diffondi all'interno dell'eritrocita. Quest'ultimo viene calcolato utilizzando le più classiche equazioni di diffusione e valutando la distanza che la molecola deve percorrere attraverso un semplice modello di distribuzione degli eritrociti nel condotto. Si identificano in $Q = 40 \mu\text{l/min}$ e $H_T \leq 0.15$ i valori più adeguati per rispettare queste prerogative (Fig. 2).

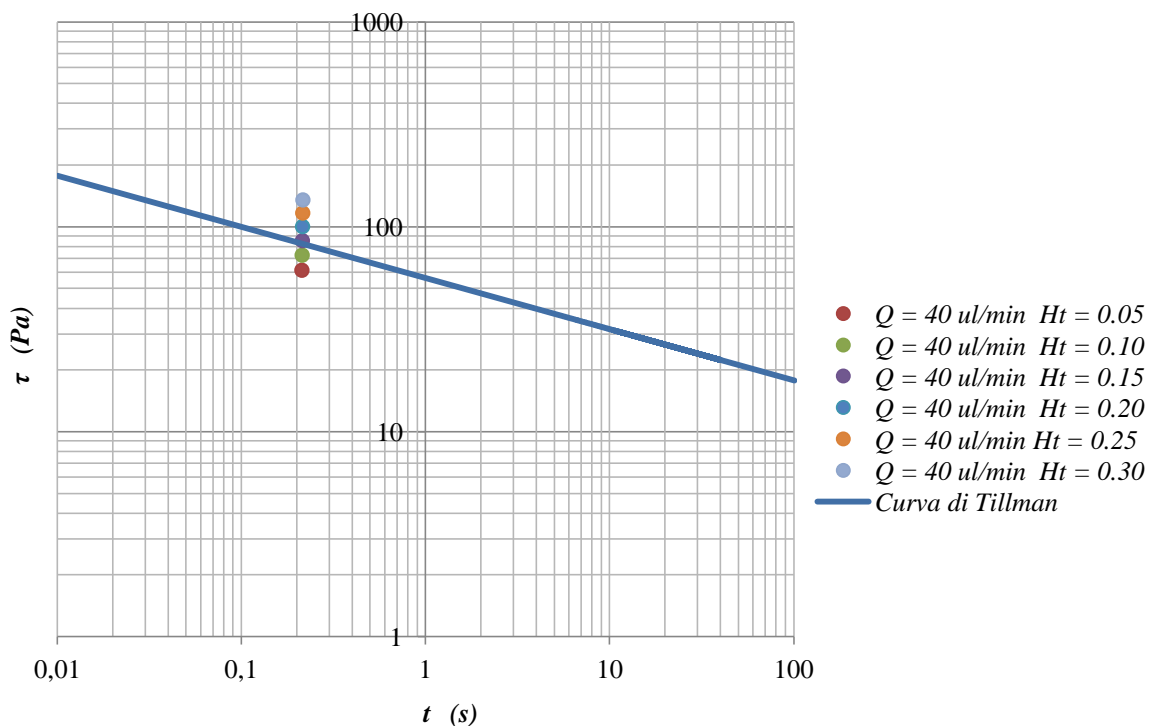


Fig. 2 Diagramma di Tillman e coppie di valori τ - t

Analizzando le perdite di carico si riscontrano valori elevati che potrebbero dare problemi nell'esecuzione di prove sperimentali. Per questo motivo è stata modificata la geometria

aumentando la profondità del capillare e mantenendo costante l'altezza ($50 \times 2000 \mu\text{m}$, lunghezza pari a 58.5 mm). In questo caso si identifica in $Q = 1600 \mu\text{l/min}$ e H_T compreso tra 0.05 e 0.30 la condizione di sollecitazione migliore.

Per individuare all'interno del capillare quell'area che se attraversata dal globulo garantisce l'incapsulamento, è stato definito un indice I_e dato dal prodotto normalizzato di tre grandezze: velocità, shear stress, frazione in volume della fase dispersa. L'area a maggior efficacia d'incapsulamento è caratterizzata da valori di I_e compresi tra 0.8 e 1 (Fig. 3). Studi sperimentali consentono inoltre di affermare che queste zone sono anche quelle in cui si concentrano maggiormente i globuli durante il loro moto.

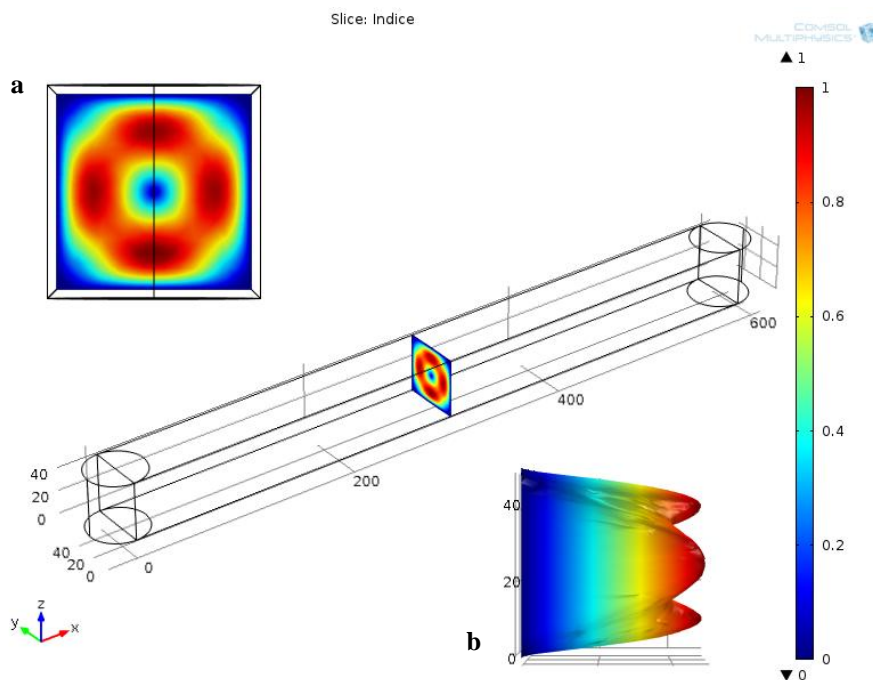


Fig. 3 Profilo e valori dell'indice di efficacia per il capillare a sezione quadrata ($Q = 40 \mu\text{l/min}$, $H_T = 0.05$): a. piano y-z; b. piano z-x (per rendere comprensibile la geometria del condotto la lunghezza è stata ridotta di 100 volte rispetto al valore reale)

Con questo lavoro sono state definite le condizioni migliori in termini di portata, ematocrito, perdite di carico e geometria del capillare per ottenere l'incapsulamento di molecole all'interno di eritrociti. Un simile modello risulta essere un valido strumento che permetterà di valutare a priori le prestazioni di ulteriori possibili set-up, qualora a livello sperimentale si evidenziassero nuove esigenze.

SUMMARY

Erythrocytes can be used as potential drug carriers, thanks to their ability to reach every district of the human body and the high number of this type of cell available in the blood. Their structure and the capability of masking the cytoplasmic content has also contributed to the idea of using them as a controlled drug delivery system.

In this regard, over the past few decades, numerous studies have demonstrated the ability to encapsulate molecules inside red blood cells. Physical, chemical or mechanical stresses are able to produce the temporary opening of pores on the cell membrane, which allows a passive diffusion process, in presence of a difference in concentration between inside and outside the cell. This mechanism allows migration of substances to and from the erythrocyte. After the stimulus, the pores close again and the molecules remain trapped until hemolysis (either physiological or induced by external stimuli) occurs.

Recent studies have demonstrated the possibility of encapsulating molecules in erythrocytes stressed by exploiting the shear forces that arise within a moving fluid. In particular, the current study aims to validate a previous research, where this technique is applied in micro channels. In order to better understand the fluid dynamics within these capillaries and optimize the encapsulation process, a computational model has been developed and a computational analysis was performed.

The goal of this project is to find the most suitable flow condition promoting the process of encapsulation. This is assumed to happen when the pairs of value τ - t (average tangential stress – average stress time) are positioned near the straight line of Tillman. The appropriate flow rate that provides at the same time adequate values of shear stresses and times of passage of the blood in the capillary has to be found. This time is required to be higher than the time required for the molecule to diffuse in the erythrocyte. The fluid-dynamics in the capillary is calculated by solving the Navier-Stokes equations for the incompressible fluid, while the dynamic of the molecules is calculated using classical equations of diffusion and evaluating the distance that the molecule has to cover using a simple model of the distribution of red blood cells in the duct.

Using the software COMSOL Multiphysics 4.2a (COMSOL AB , Stockholm , Sweden), we reproduced the geometry of the capillary ($46.79 \times 64.73 \mu\text{m}$, 58.5 mm , cross section and length respectively), the working fluid (a suspension of red blood cells in PBS) and we set the values of flow rate and hematocrit used in experimental protocol ($Q = 0.25$ and $0.50 \mu\text{l/min}$, $H_T = 0.01$ and 0.05).

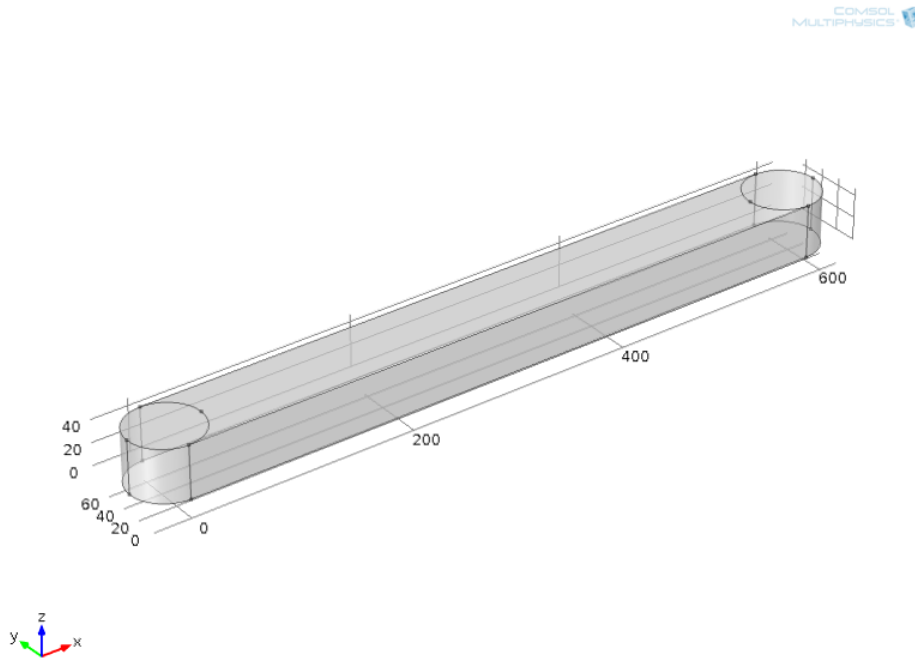


Fig. 1 Geometry of capillary (length has been reduced 100 times compared to the real value, for better visualization)

The " Mixture Model" is considered to be the most appropriate flow model to derive the quantities of interest, such as velocity profile, volume fraction of dispersed phase and shear stress. This description allows to reproduce the behavior of mixtures characterized by rigid and spherical particles immersed in a fluid. Since it does not allow the visualization of the particles and their trajectory, a second model was introduced, allowing the coupling of the "Laminar Flow Model" with the "Particle Tracing for Fluid Flow Model". The first block calculates the fluid-dynamics of the fluid, which are then used by the second module as an input to derive the trajectories of the dispersed particles.

A tetrahedral mesh was chosen whose dimensions were defined according to the results of a sensitivity analysis.

The values of the maximum speed and maximum shear stresses obtained experimentally were compared with those obtained by numerical simulations. The differences between the values of these quantities are caused by an incorrect approximation of the velocity profile detected experimentally.

Optimization tests were carried out by changing the size of the geometry of the capillary (50 x 50 μm and length equal to 58.5 mm).

We have identified in $Q = 40 \mu\text{l}/\text{min}$ and $H_T \leq 0.15$ the most appropriate values to meet the required specifications (Fig.2).

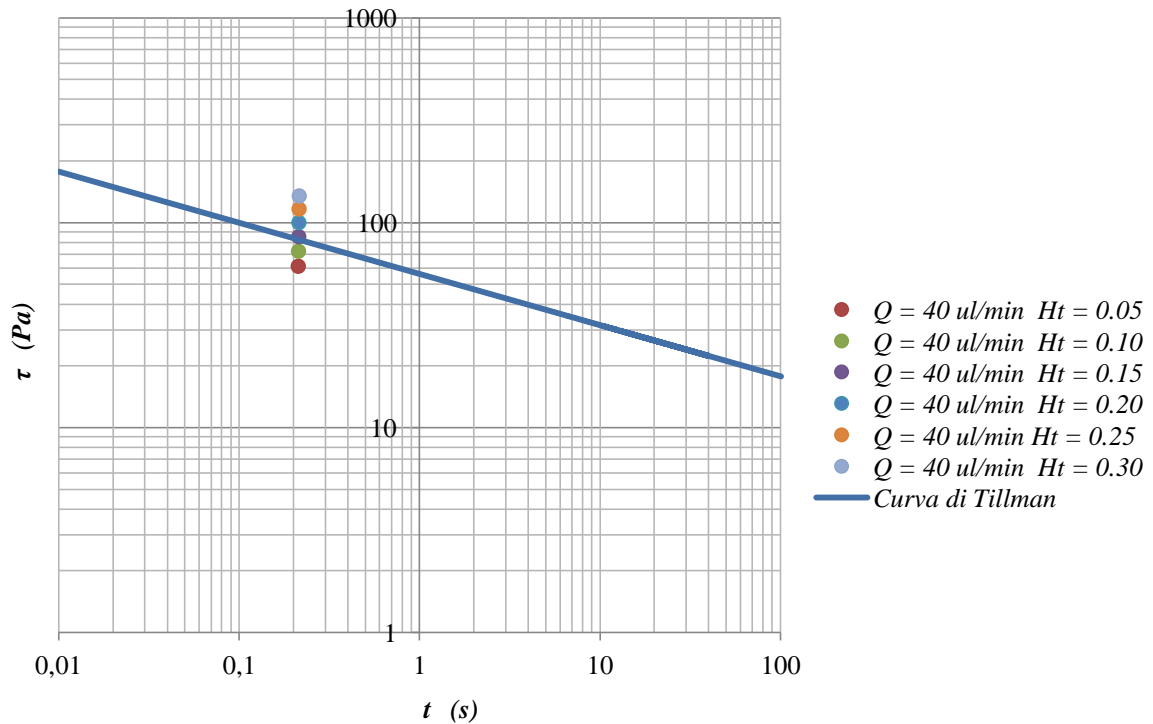


Fig. 2 Straight line of Tillman and value pairs τ - t

The high values of pressure drop could give problems in the execution of experimental tests. For this reason, the geometry has been modified. The depth of the capillary has been increased and the height (50 x 2000 μm , length of 58.5 mm) has been maintained constant. In this case the better stress condition is provided by $Q = 1600 \mu\text{l}/\text{min}$ and H_T between 0.05 and 0.30.

Thanks to our analysis, it was possible to define a normalized index (I_e) identifying the area inside the capillary where the performance of the encapsulation is the highest. I_e is calculated as the product of three variables: velocity, shear stress and volume fraction of the dispersed phase. The optimal values estimated for this index are in the range between 0.8 and 1 (Fig. 3).

In support of our results, experimental studies available from the literature demonstrate that erythrocytes flow through these areas for the most part during their motion.

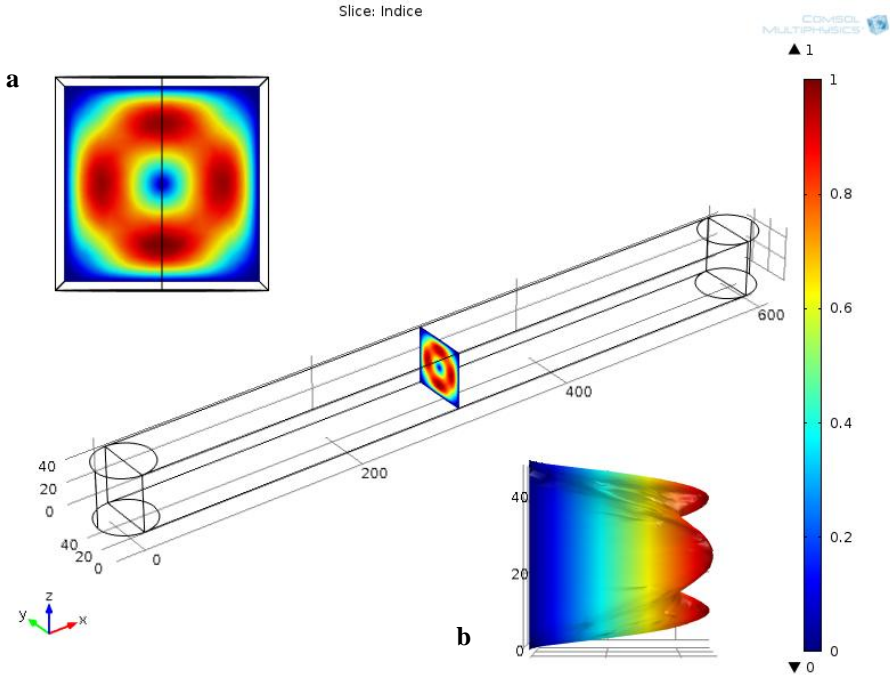


Fig. 3 Profile and values of the index of effectiveness for the capillary with a square section ($Q = 40$ l/min , $H_T = 0.05$): a. y -z plane , b. z-x plane (length has been reduced 100 times compared to the real value, for better visualization)

In conclusion, this work wants to propose a computational model to characterize the fluid-dynamic condition in micro-channels for drugs inclusion in red blood cells. This study allowed to defined the best conditions for the flow rate, hematocrit, pressure drop and geometry of the capillary to optimize the encapsulation process. This model could also be used in the future to predict the performances of new experimental set-up.

1. INTRODUZIONE

L'incapsulamento di molecole all'interno di globuli rossi per la realizzazione di sistemi a rilascio controllato di farmaci rappresenta un ambito di ricerca in continua evoluzione. L'enorme vantaggio rappresentato dall'uso degli eritrociti come carrier di sostanze chimiche deriva dalla loro naturale capacità di raggiungere ogni distretto corporeo. Le metodiche utilizzate per inglobare le molecole probanti sfruttano la formazione di pori temporanei sulla membrana del globulo rosso in risposta a sollecitazioni fisiche, chimiche o meccaniche. L'apertura dei pori consente la migrazione per diffusione di sostanze da e verso la cellula. Terminata la sollecitazione i pori si richiudono e ciò che è entrato rimane intrappolato. Il rilascio del contenuto cellulare avverrà nel distretto d'interesse per emolisi naturale o come conseguenza di stimoli esterni.

Numerosi studi hanno dimostrato la possibilità di inglobare molecole sollecitando la membrana con gli sforzi tangenziali che nascono all'interno di un fluido in movimento. Questo lavoro ha come scopo la realizzazione di un modello computazionale che consenta di studiare la fluidodinamica all'interno di canali micrometrici. L'analisi del profilo di velocità, della distribuzione degli sforzi di taglio e delle grandezze da cui dipendono rappresenta la base per la ricerca delle condizioni ottimali che favoriscono l'incapsulamento. Verranno selezionate le portate opportune che garantiscono la giusta combinazione tra shear stress e durata della sollecitazione in modo tale da porsi in prossimità della retta di Tillman, senza però indurre emolisi cellulare. Sarà inoltre identificata l'area all'interno del condotto a maggior efficacia d'incapsulamento.

Un'analisi dettagliata delle caratteristiche e della reologia del sangue (Cap. 2) e delle tecniche di incapsulamento tradizionali e in via di sviluppo (Cap. 3) fa da premessa alla descrizione del modello computazionale (Cap. 4). Nel capitolo 5 vengono riportati i risultati ottenuti, discussi poi nel capitolo 6, tenendo conto delle approssimazioni fatte in fase di definizione del modello. Nelle conclusioni verranno indicati i possibili sviluppi futuri di questo lavoro (Cap. 7).

2. IL SANGUE

Il sangue è un tessuto fluido che scorre nell'apparato cardiocircolatorio e raggiunge i diversi organi e tessuti del corpo. È costituito per il 50-60% del volume da una frazione liquida, il plasma, e per il 40-50% da una frazione corpuscolata formata da cellule (globuli rossi e globuli bianchi) e frammenti cellulari (piastrine) [1].

Il sangue svolge numerose funzioni [1-5]:

- trasporto di ossigeno e anidride carbonica per mezzo dell'emoglobina contenuta nei globuli rossi;
- trasporto di sostanze nutritive alle cellule e rimozione dalle stesse di sostanze di scarto (cataboliti);
- trasporto di enzimi, vitamine e ormoni secreti dai diversi organi;
- trasporto di proteine tra cui anticorpi che, insieme ai globuli bianchi, presiedono alla difesa dell'organismo;
- emostasi svolta dalle piastrine per arrestare emorragie interne o esterne;
- concorre a mantenere stabili le condizioni di acidità interna (pH);
- contribuisce a rendere uniforme la temperatura corporea trasferendo calore dagli organi interni verso i tessuti superficiali dove può venire disperso.

2.1 Il plasma

Il plasma è costituito per il 90% da acqua e funge da mezzo di trasporto per le cellule del sangue e le piastrine. Dispersi in questo liquido vi sono ioni e molecole: i primi rappresentano la componente minerale (cloruro di sodio, cloruro di potassio, calcio e magnesio), le seconde la componente organica costituita da lipidi, glucidi, vitamine, ormoni, amminoacidi, gas disciolti (O₂, CO₂, N₂) e centinaia di proteine plasmatiche diverse [1].

Queste ultime svolgono differenti funzioni:

- trasporto di lipidi e vitamine liposolubili;
- intervengono nel processo di coagulazione del sangue (fibrinogeno) o nei meccanismi di risposta immunitaria (elaborazione delle globuline, anticorpi naturali o acquisiti dall'organismo);
- concorrono alla determinazione della pressione osmotica del plasma, necessaria per garantire lo scambio di liquidi con i fluidi interstiziali.

2.2 Globuli bianchi

I globuli bianchi (o leucociti) si formano dalle cellule staminali del midollo osseo. Sono dotati di nucleo e leggermente meno deformabili dei globuli rossi. Hanno un ruolo fondamentale nel lavoro quotidiano di mantenimento dell'organismo e nella sua difesa, come l'eliminazione di cellule morte o danneggiate e di qualsiasi sostanza che non appartiene al corpo. Molti si concentrano nei linfonodi e nella milza dove si dividono per formare le cellule specializzate nella difesa contro virus, batteri e altri agenti patogeni [1].

Esistono tre differenti tipologie di globuli bianchi: granulociti, linfociti e monociti che in condizioni di salute normali costituiscono rispettivamente il 70, il 25 e il 5% del totale.

I granulociti si dividono in neutrofili, eosinofili e basofili. Hanno vita media breve, dalle 12 alle 36 ore, e vengono distrutti nel fegato e nella milza. I neutrofili fagocitano microbi, gli eosinofili aggrediscono i parassiti e fagocitano i complessi antigene-anticorpo, i basofili secernono sostanze anticoagulanti o vasodilatatrici come l'istamina e la serotonina.

I linfociti sono dotati di un grosso nucleo e la loro funzione è quella di individuare gli agenti patogeni e marcarli per il successivo riconoscimento da parte dei granulociti e dei monociti. Si dividono in due classi:

- linfociti B, producono gli anticorpi i quali riconoscono determinate porzioni proteiche (epitopi) attuando la risposta umorale;
- linfociti T, si suddividono a loro volta in "killer", "repressori" e "ausiliari". Rispettivamente attaccano gli agenti patogeni, regolano l'azione immunologica e stimolano l'attività dei linfociti B e dei macrofagi.

I monociti sono le cellule del sangue più grandi, una volta maturi vengono immessi in circolo dove permangono dalle 24 alle 36 ore. In presenza di un focolaio infiammatorio migrano nei tessuti connettivi dove danno origine ai macrofagi, iniziando così un'intensa attività fagocitaria accompagnata dalla produzione di sostanze con funzioni difensive.

I globuli bianchi rappresentano meno dell'1% in volume delle cellule del sangue [1].

2.3 Piastrine

Le piastrine sono il prodotto della frammentazione di cellule giganti (megacariociti) che, a loro volta, derivano da alcune cellule staminali contenute nel midollo osseo. Questi frammenti cellulari, che hanno una vita di 5-9 giorni, hanno forma sferica o ovale con diametro medio di 3 μm . A seguito di una lesione dei vasi, partecipano all'emostasi e alla difesa dell'organismo da sostanze estranee. Durante l'emostasi le piastrine rilasciano sostanze che svolgono un'azione vasocostrittiva (serotonina) e attivano proteine come il fibrinogeno che viene convertito in questo modo in fibrina avviando così il processo coagulativo [1].

2.4 Globuli rossi

I globuli rossi (o eritrociti) originano dagli eritroblasti attraverso un processo di differenziazione (eritropoiesi) che si sviluppa interamente nel midollo osseo a partire da cellule staminali. Una volta mature, le cellule vengono rilasciate nel sangue dove svolgono l'importante funzione di trasporto di ossigeno e anidride carbonica per mezzo dell'emoglobina in esse contenuta.

Hanno forma di dischi biconcavi con un diametro di 8 μm e uno spessore massimo di 2.58 μm . L'alta deformabilità permette ai globuli di passare anche attraverso i capillari più piccoli modificando temporaneamente la loro forma.

Sono cellule prive di nucleo delimitate esternamente da una membrana, lo stroma. L'assenza di nucleo permette loro di consumare meno ossigeno rispetto alle altre cellule dell'organismo e compiere nel modo più efficiente possibile la loro funzione.

Rappresentano il 99% della popolazione cellulare del sangue e permangono in circolo per un tempo che varia, in condizioni fisiologiche, da 90 a 120 giorni.

In un microlitro di sangue sono presenti in media 5,4 milioni di globuli nell'uomo e 4,8 milioni nella donna [1].

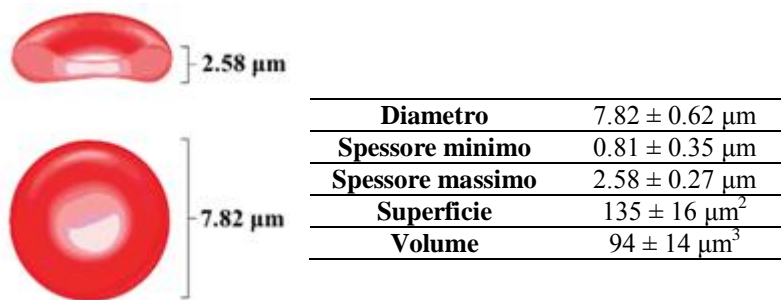


Fig. 2.1 Dimensioni caratteristiche degli eritrociti

2.4.1 Trasformazioni morfologiche

I globuli rossi, in seguito a trattamenti farmacologici oppure spontaneamente in vitro, possono subire trasformazioni morfologiche isovolumetriche. Si distinguono due diverse conformazioni: echinocitica e stomatocitica [2].

Nel primo caso il globulo presenta una membrana caratterizzata da proiezioni corte e uniformemente distribuite, in numero e dimensioni dipendenti dal livello della trasformazione.

Secondo la classificazione di Bess [6], si distinguono quattro diverse morfologie:

- echinocita I: discocita dai contorni irregolari con più di cinque incurvamenti visibili al SEM;
- echinocita II: globulo piatto con più spicole;
- echinocita III: globulo ovoidale o sferico con più 30 spicole;
- sferoechinocita I e II: globulo sferico con molte spicole corte e sottili.

Queste cellule sono caratterizzate da un aumento dell'area superficiale e da una minore deformabilità. Inoltre, la presenza delle protuberanze causa un aumento delle interazioni tra le cellule quindi un aumento della viscosità del sangue. L'aumento della viscosità è maggiormente pronunciato a bassi valori di shear rate (0,1-1,0 s⁻¹). Infatti se la velocità di deformazione è elevata, la superficie dell'echinocita viene parzialmente levigata ad opera delle forze di taglio. L'elevata viscosità delle sospensioni di echinociti potrebbe avere conseguenze sul flusso del sangue all'interno dei vasi di grosso calibro.

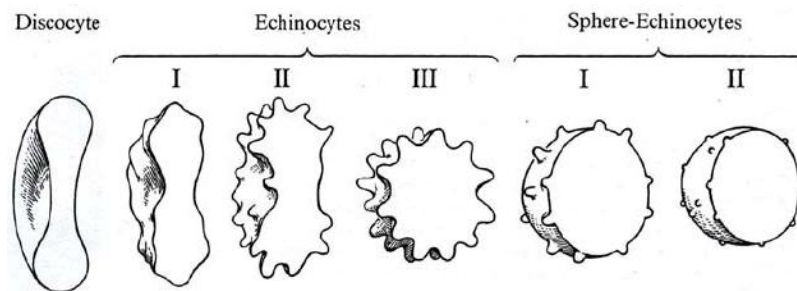


Fig. 2.2 Degenerazione della morfologia degli eritrociti

Le cellule stomatocitiche presentano un'aumentata sfericità e un'unica concavità d'entità variabile a seconda del livello di trasformazione.

Si distinguono quattro diverse morfologie:

- stomatocita I: globulo a forma di cappello (RBC convesso concavo);
- stomatocita II: globulo con una pronunciata concavità;
- stomatocita III: globulo con una profonda concavità e una distorsione della membrana e/o piccole indentazioni della stessa;
- sferostomatocita: globulo sferico con un'area irregolare di piccole cavità.

Gli stomatociti presentano una minore deformabilità, quindi una maggior difficoltà ad attraversare piccoli vasi. Vengono rapidamente rimossi dalla circolazione per opera della milza.

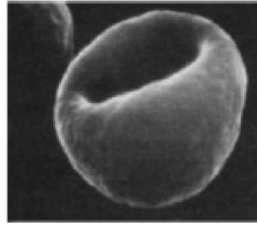


Fig. 2.3 Stomatocita tipo I

Si comprende come la normale forma di discocita rappresenti la morfologia ottimale per il flusso in vivo.

2.4.2 Stroma

La membrana dell'eritrocita, detta anche stroma, delimita la cellula e ne determina la forma biconcava. Rappresenta l'1% del peso totale, con un'estensione superficiale di circa $140 \mu\text{m}^2$. Fornisce al globulo rosso una superficie deformabile e resiliente che lo rende capace di attraversare capillari di dimensioni inferiori al proprio diametro [1].

Lo stroma svolge le seguenti funzioni:

- regolazione del contenuto cellulare grazie alle funzioni di trasporto attivo e passivo e alla permeabilità selettiva ai cationi;
- mantenimento di un gradiente ionico rispetto all'ambiente extracellulare;
- regolazione delle interazioni con le cellule e il mezzo circostanti.

Dal punto di vista biochimico, la membrana è costituita da lipidi, proteine e carboidrati, questi ultimi associati con i primi due a dare glicoproteine e glicolipidi.

Un modello spesso usato per descrivere la struttura e l'organizzazione della membrana cellulare è il modello a "mosaico fluido". La membrana si presenta come un doppio strato di fosfolipidi, molecole anfipatiche con teste idrofile e code idrofobe. In presenza di soluzioni acquose tali molecole si dispongono con la porzione idrofila a contatto con l'acqua mentre quella idrofoba a contatto con la corrispondente parte di un secondo fosfolipide.

Altri componenti lipidici della membrana sono lipidi neutri (in gran parte colesterolo) e glicosfingolipidi. Il colesterolo è intercalato nel doppio strato fosfolipidico diminuendone la fluidità, ma aumentando la stabilità meccanica e la flessibilità della cellula.

Le proteine di membrana appartengono a diverse categorie a seconda della funzione svolta:

- funzione catalitica (canale di trasporto per gli anioni, pompa sodio-potassio, canale per il trasporto del glucosio);
- funzione di recettori (glicoproteine, antigeni per il gruppo sanguigno).

Le proteine strutturali (spectrina, actina) formano invece un citoscheletro sub-membrana con funzione di sostegno e stabilizzazione della membrana stessa. Costituiscono un'impalcatura stabile sulla quale possono ancorarsi e muoversi le altre molecole di membrana.

2.4.3 Proprietà meccaniche dello stroma

Il globulo rosso può essere modellato, dal punto di vista meccanico, come una sottile membrana che racchiude un liquido viscoso newtoniano.

La membrana ha comportamento viscoelastico e viscoplastico [2-5].

Per un ampio intervallo di valori di forza applicata (fino a 10^{-11} N) e per brevi intervalli di tempo (fino a 100 s), la membrana può subire notevoli deformazioni (ad area e spessore costanti) tornando poi alla configurazione indeformata in un certo intervallo di tempo (viscoelasticità).

In risposta ad una sollecitazione opportuna la membrana subisce nel tempo deformazioni irreversibili (comportamento viscoplastico): deformazione per creep a bassi valori di forza applicata per lunghi intervalli di tempo (5-10 min), deformazione plastica permanente per alti valori di forza applicata ($>10^{-11}$ N).

Lo stroma offre una bassa resistenza ad elongazioni uniassiali e a deformazioni che ne modificano la forma, ma oppone un'elevata resistenza a variazioni di densità superficiale e area. La membrana è incompressibile nella direzione normale alla superficie, mentre si considera limitata e trascurabile la variazione di spessore nelle altre direzioni.

La resistenza all'espansione è attribuita al doppio strato fosfolipidico mentre la resistenza al taglio è attribuita al citoscheletro.

La flessibilità della membrana ha però dei limiti, gli eritrociti dimostrano infatti, nelle varie condizioni di stress a cui sono sottoposti, una relativa fragilità che porta alla lisi degli stessi.

Per poter determinare il valore di sforzo a rottura non è possibile utilizzare un approccio classico basato su prove a trazione effettuate su campioni di materiale. Si ricorre invece all'approccio sperimentale proposto da Rand nel 1964 [7,8]. Questo metodo permette di eseguire studi sulle caratteristiche meccaniche della membrana più che sulla resistenza a trazione della stessa.

Mediante una pipetta di vetro del diametro di pochi micron, si risucchia parzialmente un globulo rosso creando una depressione all'interno dello strumento. La deformabilità della membrana consente il raggiungimento di una situazione limite ideale che consente il calcolo della tensione agente sulla cellula: il globulo rosso si dispone secondo una porzione di sfera all'esterno, un tratto cilindrico molto breve e una porzione di sfera all'interno della pipetta.

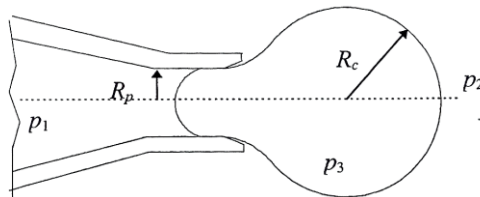


Fig. 2.4 *Esperimento di Rand*

Supponendo il globulo rosso sollecitato uniformemente (sollecitazione di trazione) da una tensione s sulla superficie, sia all'interno che all'esterno della pipetta si ha

$$p_3 - p_2 = \frac{2s}{R_c} \tag{2.1}$$

$$p_3 - p_1 = \frac{2s}{R_p} \tag{2.2}$$

Queste due equazioni sono ricavate applicando la legge di Laplace, $P = s \cdot \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$, alle due interfacce emisferiche (raggi di curvatura della pipetta $R_1 = R_2 = R_p$, raggio di curvatura dell'eritrocita $R_1' = R_2' = R_c$).

Risolviendo il sistema in p3, si ottiene

$$s = \frac{p_2 - p_1}{2 \left(\frac{1}{R_p} + \frac{1}{R_c} \right)} \quad (2.3)$$

Si comprende come per ricavare la tensione superficiale s , sia sufficiente conoscere le pressioni e la geometria della cellula.

A seguito dell'ipotesi fatta in precedenza e trascurando la complessità dello stato di sollecitazione cui è soggetta la membrana, il valore di s trovato è solo una stima della tensione reale.

Sulla base dell'esperienza di Rand è stato proposto un modello di membrana a parametri concentrati (Fig. 2.5).

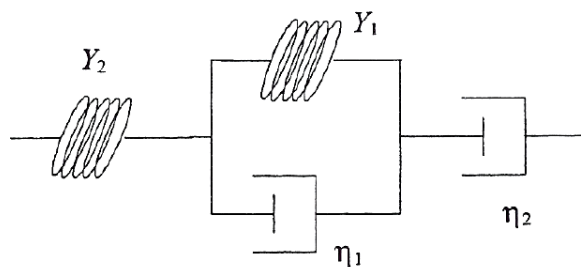


Fig. 2.5 Modello viscoelastico per lo studio del comportamento della membrana del globulo rosso

Il modello non rappresenta propriamente la membrana (per sua natura bidimensionale), ma il legame tra la sollecitazione s e la deformazione δ .

$$\delta = s \cdot \left\{ \frac{1}{Y_2} + \frac{1}{Y_1} \cdot \left[1 - \exp \left(-\frac{Y_1}{\eta_1} \cdot t \right) \right] + \frac{1}{\eta_2} \cdot t \right\} \quad (2.4)$$

Dove Y e η sono rispettivamente il modulo elastico e la viscosità.

I risultati sperimentali suggeriscono l'ipotesi che la rottura avvenga ad una deformazione critica δ_c (Fig. 2.6)

$$\frac{1}{s} = \frac{1}{\delta_c} \cdot \left\{ \frac{1}{Y_2} + \frac{1}{Y_1} \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{Y_1}{\eta_1} \cdot t\right) \right] + \frac{1}{\eta_2} \cdot t \right\}$$

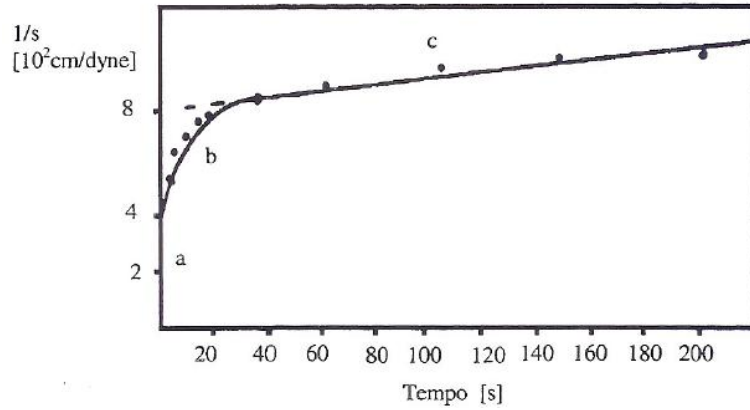


Fig. 2.6 Diagramma di Rand per la membrana del globulo rosso

La curva mostra tre fasi distinte:

- deformazione della molla Y_2 ;
- equilibrio dinamico tra lo smorzatore η_1 e la molla Y_1 , il quale tende a caricare dopo un certo tempo la molla;
- scorrimento continuo determinato dallo smorzatore η_2 .

I risultati sperimentali hanno permesso di ricavare la deformazione critica $\delta_c = 10 \text{ \AA}$, i valori dei moduli di Young $Y_1 \approx Y_2 = 3 \cdot 10^8 \text{ dyne/cm}^2$ e i valori di viscosità $\eta_1 \approx 2.4 \cdot 10^8 \text{ P}$, $\eta_2 \approx 6 \cdot 10^7 \text{ P}$.

Pur essendo soltanto risultati indicativi mostrano un comportamento piuttosto rigido della membrana, con un modulo di Young prossimo a quello del collagene (10^9 dyne/cm^2).

Ulteriori esperimenti hanno mostrato che il criterio di rottura della membrana può essere espresso nella forma

$$\frac{(\varepsilon_1 + \varepsilon_2)^2}{2 \cdot a^2} + \frac{(\varepsilon_1 + \varepsilon_2)^2}{2 \cdot b^2} = 1 \quad (2.5)$$

dove $\varepsilon_1, \varepsilon_2$ sono le deformazioni principali logaritmiche o naturali esprimibili in funzione delle deformazioni classiche

$$e = \frac{L-L_0}{L_0} \quad (2.6)$$

$$\varepsilon = \ln(1 + e) \quad (2.7)$$

L'equazione di ellisse sopra riportata è rappresentabile nel piano $\varepsilon_1\varepsilon_2$, imponendo condizioni note sperimentalmente.

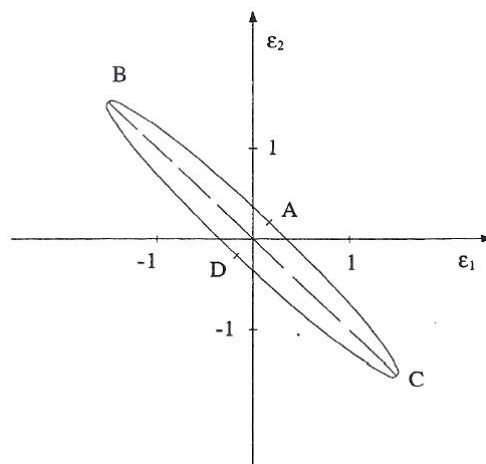


Fig. 2.7 Ellisse per la determinazione della rottura della membrana del globulo rosso

L'incremento percentuale di area in condizione deformata è uguale a

$$\frac{A-A_0}{A_0} = \varepsilon(e_1+e_2) - 1 = (1 + \varepsilon_1)(1 + \varepsilon_2) - 1 \quad (2.8)$$

In accordo con Rand si pone al punto A la rottura per tensione uniforme per

$$\frac{A-A_0}{A_0} = 0.172$$

$$e_1 = e_2 = 0.082 \quad (2.9)$$

$$\varepsilon_1 = \varepsilon_2 = 0.00786$$

Infatti Rand trovò che l'area della membrana dell'eritrocita cresceva in media da 146 a 171 μm^2 . Altri test hanno suggerito i valori per i punti B,C e D. È difficile comprendere a fondo il meccanismo di rottura in D, esso potrebbe essere dovuto a pieghe in compressione.

2.5 Emolisi

L'emolisi è il fenomeno di rottura della membrana dell'eritrocita dovuta a cause fisiologiche, patologiche o a sollecitazioni indotte di vario tipo, con conseguente fuoriuscita del contenuto citoplasmatico [1].

La rottura della membrana del globulo rosso può essere dovuta a molteplici fattori come deformazioni globali e/o locali del doppio strato lipidico, dalla formazione di pori che non si richiudono rapidamente o da strappi di dimensioni paragonabili a quelli della cellula stessa.

È possibile modellizzare la membrana cellulare del globulo rosso come un materiale che a seguito di particolari sollecitazioni meccaniche può presentare micropori. Da questi, tramite processi diffusivi, possono essere più o meno rilasciate molecole come l'emoglobina, o possono essere assorbite altrettante sostanze. In questo senso, risultano importanti il tipo, l'intensità e la durata della sollecitazione. Di conseguenza i pori potranno richiudersi al cessare della sollecitazione o degenerare in maniera irreversibile in fratture [2-5].

L'emolisi fisiologica avviene continuamente nell'organismo sano come naturale completamento del ciclo di vita biologico di ogni eritrocita. Questo tipo di emolisi è opera del sistema reticolo endoteliale (RES) e di altri organi quali fegato e milza. L'emoglobina rilasciata viene filtrata dai reni ed eliminata con l'urina. Lo stroma viene fagocitato a livello del fegato e della milza. I globuli rossi hanno una vita media di circa 120 giorni [1].

Condizioni patologiche possono causare un aumento della distruzione degli eritrociti, con conseguente aumento della concentrazione di emoglobina libera e saturazione della

capacità filtrante del rene. Si ritiene dannoso con pericolo di tossicità, un livello di emoglobina libera di circa 150-160 g/dl, a fronte di 0.1 mg/dl in condizioni fisiologiche. La riduzione dell'ematocrito instaura inoltre fenomeni di scarsa ossigenazione del sangue, quali anemia [1].

L'entità dell'emolisi nel sangue si determina misurando la variazione di emoglobina libera nel plasma. Questa analisi può essere effettuata valutando, con uno spettrofotometro, l'assorbanza, il cui valore è proporzionale alla concentrazione di Hb disciolta nel plasma [14].

L'emolisi può essere causata anche da sollecitazioni di tipo chimico, termico, pressorio, osmotico e meccanico.

L'emolisi chimica può essere indotta da varie sostanze che tendono a distruggere lo stroma (veleno di serpenti e insetti, sali biliari, tossine di batteri).

L'emolisi termica è causata dal raggiungimento di temperature superiori ai 43°C o da repentine variazioni di temperatura.

L'emolisi di tipo pressorio è dovuta non tanto a fenomeni di compressione (anche se molto elevati, ≈ 500 mmHg), ma principalmente a pressioni negative. Il valore di soglia è attorno a -120 mmHg.

L'emolisi da rigonfiamento osmotico nasce immergendo il globulo in soluzioni ipotoniche. L'ingresso di acqua ne causa rigonfiamento, aumento della sfericità e rottura della membrana o apertura di canali con conseguente fuoriuscita di emoglobina [2-5].

2.5.1 Emolisi meccanica

L'emolisi meccanica si sviluppa come conseguenza del danneggiamento della membrana dell'eritrocita in seguito all'applicazione di uno stato di sollecitazione meccanica.

La principale causa di emolisi meccanica è rappresentata dagli sforzi di taglio che si generano per effetto della viscosità e del moto fluido dei globuli rossi. In questo tipo di emolisi, oltre all'intensità dello sforzo, ha funzione preminente anche il tempo di esposizione del sangue a tale sollecitazione.

La lisi dello stroma può nascere come effetto cumulato di più danneggiamenti sub emolitici. In questo caso giocano un ruolo fondamentale l'entità e la frequenza di sollecitazione.

In questo campo, importanti risultati derivano dagli studi di Leverett prima e di Tillman poi. I due misero in relazione gli sforzi di taglio critici con le relative durate di applicazione riunendo in un unico diagramma bi-logaritmico i risultati precedentemente ottenuti da altri ricercatori (Fig. 2.8).

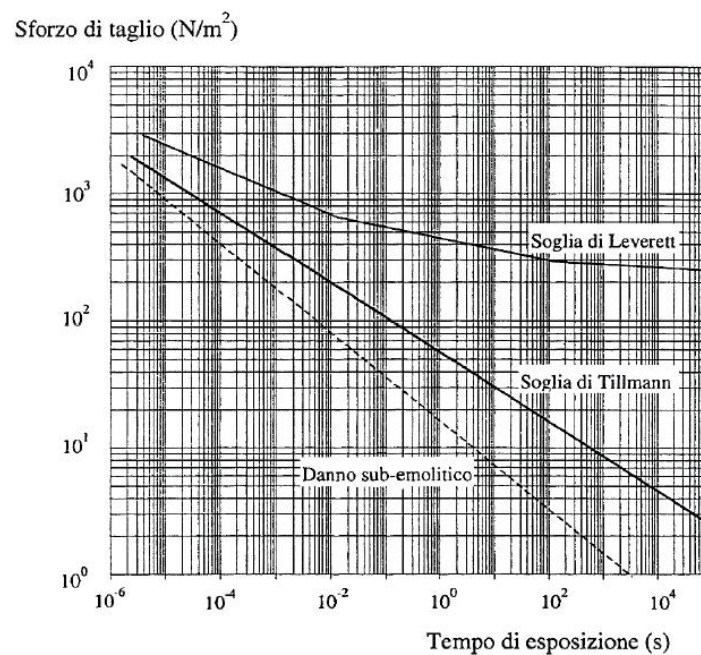


Fig. 2.8 Diagramma di Tillman e Leverett

Il piano τ - t così ottenuto risulta diviso in due zone da una curva limite. Si identifica danneggiamento sub-emolitico al di sotto della curva ed emolisi al di sopra della stessa.

La curva limite di Tillman è definita dalla seguente espressione

$$\text{Log}(\tau) = a \cdot \text{Log}(t) + b \quad (2.10)$$

dove $a = -1/4$ e $b = 7/4$.

Il comportamento descritto da Leverett e Tillman riflette la natura viscoplastica del sangue: la risposta all'applicazione di un carico superiore ad un certo valore di soglia è tempo-dipendente e la deformazione risultante aumenta con la durata della sollecitazione. Se il carico agisce per un tempo sufficientemente breve il materiale non ha il tempo di raggiungere la deformazione a rottura.

2.5.2 Meccanismi di emolisi meccanica in un tubo

Il moto in tubi presenta particolari caratteristiche emolitiche, non dovute esclusivamente allo sforzo di taglio, ma anche alle sollecitazioni meccaniche di imbocco e uscita e all'interazione dei globuli rossi con la parete. All'interno di un tubo, in particolare in capillari, si verifica un processo costituito probabilmente dalla cascata di due meccanismi di emolisi: alla parete, dove gli eritrociti subiscono il primo e più significativo danneggiamento, e poi nel fluido, dove il danneggiamento si completa e dove l'emolisi procede ad un tasso minore.

Nel fluido, lontano dalle pareti del condotto, l'emolisi è attribuita esclusivamente allo sforzo di taglio dovuto alla viscosità del fluido e all'interazione cellula-cellula.

Alla parete l'emolisi è causata dall'interazione delle cellule con la stessa e dipende dalla rugosità della parete, dall'interazione chimica e dalle bolle intrappolate in imperfezioni della superficie solida. L'effetto emolitico può essere limitato dalla deposizione di proteine plasmatiche che, dopo un certo tempo, ricoprono la superficie della parete e svolgono un'azione protettiva sulle cellule.

Il danneggiamento del sangue nei tubi può essere dominato dalle interazioni meccaniche all'imbocco (brusco restringimento) e all'uscita (brusco allargamento) del tubo. Se il tubo non è sufficientemente lungo e stretto, il trauma maggiore per l'eritrocita è l'imbocco e la seconda fonte di danneggiamento è l'uscita; in queste condizioni la valutazione dell'emolisi all'interno del tubo causata dal solo sforzo di taglio nel fluido perde di significatività.

2.5.3 Invecchiamento cellulare

L'invecchiamento cellulare è ritenuto uno dei maggiori responsabili della diminuzione della deformabilità e dell'aumento della densità dei globuli rossi. Quest'ultimo effetto consente di separare popolazioni cellulari di età diverse mediante centrifugazione. L'invecchiamento causa negli eritrociti una fuoriuscita di elettroliti e di acqua con conseguente riduzione dell'area e del volume (MCV, Mean Corpuscular Volume) e aumento della concentrazione di emoglobina (MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration).

Un generico volume di sangue, essendo costituito da popolazioni cellulari di età diversa, presenterà un comportamento emolitico dato dal complesso dei diversi comportamenti: i primi effetti emolitici tendono a manifestarsi, per sollecitazioni limitate, proprio sulle popolazioni di globuli rossi più anziane.

Occorre inoltre tener presente che in esperimenti condotti in vitro, la deformabilità dei globuli rossi risente oltre che dell'invecchiamento anche dei metodi e della durata della conservazione [2-5].

2.6 Danno sub-emolitico

Per danno sub-emolitico si intende un danneggiamento meccanico dei globuli rossi che si verifica in modo o misura tale da non causarne la rottura, ma l'alterazione delle componenti, del contenuto o della membrana [9].

Di seguito vengono riportate le principali proprietà utilizzate come indice del danneggiamento sub-emolitico dovuto allo sforzo di taglio.

- Tasso di sopravvivenza degli eritrociti dopo la sollecitazione.
Misurato come il tempo di emivita delle cellule sottoposte a sollecitazione meccanica rispetto a quelle non soggette ai medesimi stimoli. Il trauma sub-emolitico comporta riduzione della vita media degli eritrociti, i quali perdendo la loro deformabilità sono maggiormente soggetti ad essere intrappolati dalla milza.

- Fragilità osmotica della membrana.

Una popolazione di eritrociti viene sospesa in una soluzione ipotonica e si valuta il livello di emolisi in funzione della concentrazione della soluzione stessa. La sensibilità all'emolisi osmotica aumenta tanto più rapidamente quanto maggiore è la durata di sollecitazione. Il fenomeno compare già in soluzioni poco distanti dall'isotonicità [10].

- Attività dell'enzima acetilcolinesterasi di membrana.

Si è osservata una diminuzione dell'attività di questo enzima all'aumentare della durata di sollecitazione. Essendo un costituente dello stroma, questa riduzione potrebbe indicare una perdita di parte della membrana. È interessante notare che tale riduzione accompagna il normale invecchiamento della cellula [9].

- Permeabilità di membrana agli ioni sodio (Na^+) e potassio (K^+), all'emoglobina e all'ATP.

È stato osservato un incremento della permeabilità al sodio e quindi del contenuto di sodio all'interno della cellula in eritrociti sottoposti a sforzi di 10 Pa, in un dispositivo cono-piatto per un periodo di sollecitazione di 1 ora, e, in un viscosimetro alla Couette per un periodo di 3-4 ore, sollecitando a 50 Pa. Considerando il fatto che la membrana è permeabile all'acqua, cellule che incrementano la loro concentrazione interna di sodio dovrebbero essere più sensibili ad emolisi per osmosi. Evidenze sperimentali indicano (in presenza di una quantità sufficiente di ATP) un incremento dell'attività della pompa sodio-potassio a seguito dell'incremento della concentrazione di sodio. Questo dovrebbe dimostrare che l'incremento del sodio all'interno della cellula non è dovuto a un malfunzionamento delle pompe attive bensì ad un effettivo aumento della permeabilità della membrana [10].

Studi sperimentali hanno permesso di valutare la permeabilità al sodio e al potassio della membrana eritrocitaria in funzione dello shear rate e della deformazione della cellula valutandone l'ellitticità come segue:

$$EI = \frac{(L-W)}{(L+W)} \quad (2.11)$$

dove L è la lunghezza dell'asse maggiore e W la lunghezza dell'asse minore in configurazione *tank treading* (configurazione ellissoidale nata per effetto dello shear rate, durante la quale la membrana ruota attorno al citoplasma, comportando una riduzione della resistenza viscosa all'avanzamento) [11]. La cellula, sotto l'effetto dello sforzo di taglio, varia sensibilmente la sua ellitticità, fino ad un valore di EI pari a 0,7. All'aumentare della sollecitazione, la cellula aumenta la propria deformazione, ma solo per incrementi notevoli dello sforzo di taglio (Fig. 2.9).

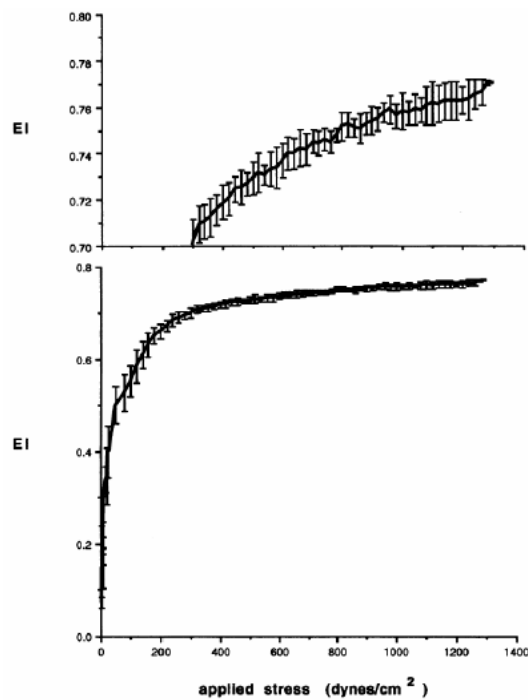


Fig. 2.9 Misura dell'ellitticità dell'eritrocita in funzione dello sforzo di taglio applicato

Il grafico di figura 2.10 mostra la permeabilità di membrana al sodio e al potassio in funzione dell'ellitticità e in funzione dello sforzo di taglio. Si osserva come il flusso di ioni attraverso la membrana, e di conseguenza variazioni della sua permeabilità, non sono misurabili fino ad elongazioni del 96%, mentre incrementando ulteriormente l'elongazione, e quindi lo sforzo applicato, il flusso aumenta rapidamente per valori di EI da 0,77 a 0,78.

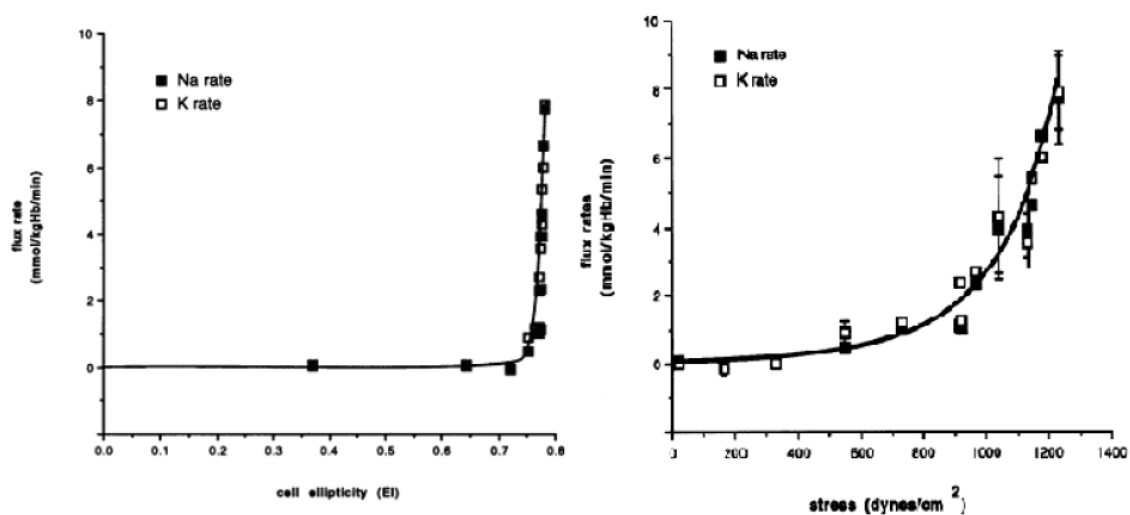


Fig. 2.10 Permeabilità degli ioni sodio e potassio, in funzione dell'ellitticità (a sinistra) e dello sforzo di taglio applicato (a destra). La sollecitazione è imposta con un reoscopio variando lo shear rate in una soluzione di PVP al 7% per i primi quattro dati; per gli altri dati, è stato impostato uno shear rate di 1500 s⁻¹, e variata la viscosità.

Per spiegare l'effetto dell'incremento di permeabilità della membrana con lo sforzo di taglio, si ipotizza che in conseguenza dello stiramento della membrana, si verifichi una graduale apertura di pori. Blackshear stimò una dimensione dei pori di 10-20 Å, che dovrebbe permettere il passaggio di Na e K, di molecole più grandi come ATP e 2-3DPG, ma non dell'emoglobina (31 Å). Chien et al. proposero che questi pori potessero raggiungere i 100 Å, ma che non rimanessero aperti per un tempo sufficiente da apprezzare la diffusione dell'emoglobina. L'esistenza di pori transitori nella membrana dell'eritrocita indotti da sforzi di taglio è ancora oggetto di dibattito. È difficile associare l'apertura di pori, specialmente di ben definite dimensioni con le molteplici modalità di fallimento plastico che possono avvenire nel modello di membrana a mosaico fluido. Sembra possibile che, sotto appropriate distribuzioni di tensione, ci possa essere un assottigliamento locale e transiente della membrana che possa permettere un flusso di molecole dentro e fuori dalla membrana dettato dal gradiente di concentrazione [10].

- Morfologia cellulare: la morfologia assunta dall'eritrocita a seguito dell'applicazione della sollecitazione meccanica può essere indice del danno subemolitico subito dalla cellula.

Una sospensione di globuli rossi sollecitata con viscosimetro e analizzata mediante microscopio a forza atomica, mostra un incremento della rugosità della superficie di ciascuna cellula all'aumentare dello sforzo di taglio applicato [12].

Prove sperimentali condotte sollecitando con un viscosimetro una sospensione di eritrociti e, successivamente, fissando le cellule con glutaraldeide, mostrano come l'entità dello sforzo, a parità di durata di esposizione, determini la permanenza o il recupero della deformazione elastica una volta cessata la sollecitazione [10]. Un minuto dopo la fine dell'applicazione, le cellule sottoposte a sforzi di 200 Pa tornano ad una forma molto vicina a quella di partenza, mentre, dopo lo stesso tempo, le cellule soggette a sforzi di 350 Pa, sono, oltre che frammentate, molto crenate: perdono cioè la forma allungata che avevano assunto nel dispositivo, ma subiscono un forte raggrinzamento, tendono cioè ad echinocizzare.

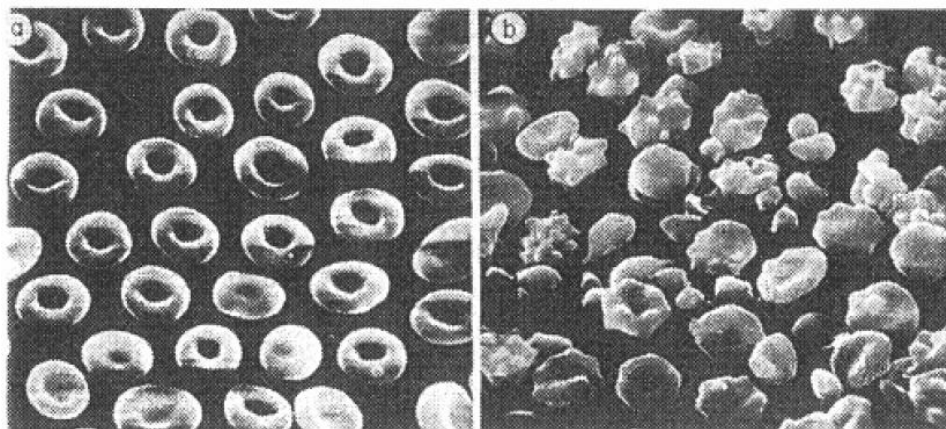


Fig. 2.11 Crenazione irreversibile della membrana degli eritrociti: a) $\tau = 200\text{Pa}$, b) $\tau = 350\text{Pa}$; la durata dell'applicazione dello sforzo è 4 min.

2.7 Reologia del sangue

A causa della sua natura corpuscolare, il sangue non può essere considerato un fluido newtoniano né omogeneo. Le sue proprietà reologiche dipendono dalla forma degli elementi figurati, dalla loro densità e deformabilità, dall'interazione reciproca, dall'ematocrito, dallo shear rate, dalla geometria e dalla dimensione del condotto.

Solo nel caso di condotti di diametro superiore a 0.3 mm, per i quali le dimensioni delle cellule sono trascurabili, è possibile modellizzare il sangue come un fluido omogeneo newtoniano.

2.7.1 Densità

La densità del sangue è funzione dell'ematocrito e, in prima approssimazione, indipendente dalla temperatura e dalla pressione del fluido. È possibile calcolarne il valore tramite la relazione

$$\rho_s = (1 - Ht) \cdot \rho_p + Ht \cdot \rho_{gr} \quad (2.12)$$

dove ρ_p è la densità del plasma, ρ_{gr} la densità dei globuli rossi e Ht l'ematocrito.

In condizione fisiologiche $\rho_p = 1028 \text{ Kg/m}^3$, $\rho_{gr} = 1090 \text{ Kg/m}^3$, $Ht = 45\%$, da cui si ottiene una $\rho_s = 1056 \text{ Kg/m}^3$.

A causa del diverso valore di densità, plasma e componente corpuscolare possono essere separati tramite centrifugazione. A seguito di questo processo, il campione di sangue appare suddiviso in tre strati: uno strato superiore trasparente di color giallo paglierino (il plasma), uno strato intermedio di colore biancastro (piastrine e globuli bianchi) e lo strato inferiore composto dai globuli rossi. Il volume occupato dagli eritrociti rispetto al volume totale rappresenta il valore di ematocrito (Ht).

2.7.2 Viscosità

La viscosità è una proprietà intrinseca di ogni fluido e rappresenta la resistenza allo scorrimento. Essa è funzione della temperatura e dello stato di moto.

Un fluido definito newtoniano è un fluido con viscosità indipendente dallo shear rate ovvero dalla variazione in direzione radiale della velocità assiale del fluido.

In questo caso la viscosità rappresenta il coefficiente di proporzionalità diretta tra lo shear rate (gradiente di velocità) e lo sforzo di taglio (tangenziale) tra i filetti fluidi. Tutto ciò esprimibile tramite la formula:

$$\tau = -\mu \cdot \frac{\partial u}{\partial y} \quad (2.13)$$

dove τ è lo sforzo di taglio, μ la viscosità e $\dot{\gamma} = \partial u / \partial y$ lo shear rate. Il segno negativo rappresenta il fatto che tale sforzo si oppone al moto del fluido.

Il sangue è definibile newtoniano solo per elevati valori di $\dot{\gamma}$ (Fig. 2.12). In questi casi la viscosità del sangue si aggira attorno a 3÷4 cP ($3\div4 \cdot 10^{-3}$ Pa·s).

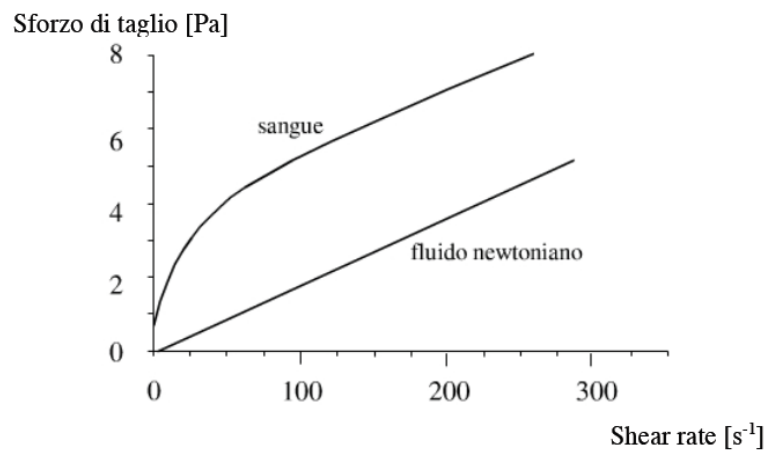


Fig. 2.12 Andamento dello sforzo di taglio al variare del gradiente di velocità (shear rate) nel caso del sangue e di un generico fluido newtoniano. La viscosità è il coefficiente angolare definibile in ogni punto della curva.

Per bassi valori di shear rate, il sangue tende a comportarsi come un fluido viscoelastico, presentando un'elevata viscosità dovuta alla formazione di aggregati cellulari (rouleaux) da

parte della componente corpuscolare. La formazione di rouleaux dipende dalla presenza di fibrinogeno e globuline. Man mano che il gradiente di velocità aumenta questi “pacchetti” si rompono favorendo lo scorrimento del fluido. La viscosità progressivamente si riduce. Ad elevati valori di shear rate le cellule si deformano assumendo una forma affusolata e allineandosi alle linee di flusso. Questo consente un’ulteriore riduzione della viscosità la quale ad un certo punto si atterrerà attorno ad un valore costante.

Questo comportamento del sangue è stato dimostrato sperimentalmente utilizzando tre diverse sospensioni di eritrociti: sangue intero (NP); globuli rossi in una soluzione di Ringer e albumina, in assenza di fibrinogeno e globuline (NA); globuli rossi, in una soluzione identica alla precedente, resi indeformabili mediante trattamento con glutaraldeide (HA) [16]. Mediante prove diverse si valuta la relazione tra viscosità e shear rate nelle tre situazioni. I risultati sono riportati in figura 2.13.

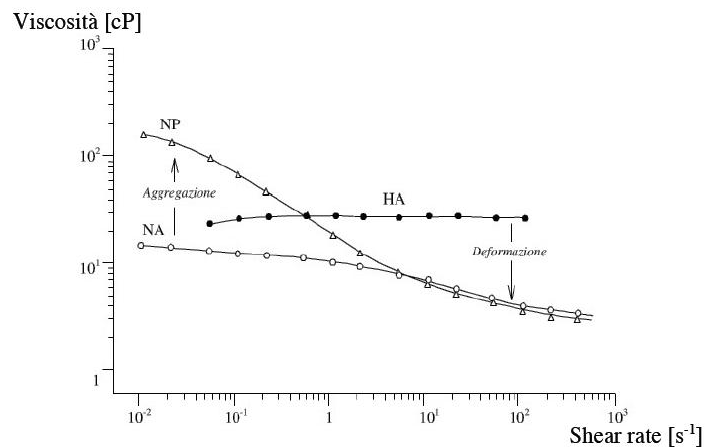


Fig. 2.13 Legame tra viscosità e shear rate nelle tre diverse sospensioni di eritrociti con $Ht=45\%$ (asse delle ascisse e delle ordinate in scala logaritmica).

Il diverso andamento delle curve Na e NP è indicativo dell’effetto di aggregazione degli eritrociti, in quanto nella sospensione NA non è presente il fibrinogeno. La differenza tra le curve NA e HA è invece significativa dell’influenza della deformazione dei globuli: il trattamento con glutaraldeide irrigidisce gli eritrociti con conseguente aumento della viscosità del sangue.

È possibile valutare e calcolare la viscosità del sangue prendendo in esame separatamente i suoi componenti.

La viscosità del plasma è funzione della temperatura (T) e della viscosità dell'acqua (μ_w):

$$\mu_w = \frac{\mu_0}{1+0.0337 \cdot T+0.00022 \cdot T^2} \quad (2.14)$$

dove μ_0 è la viscosità dell'acqua allo stato liquido a 0°C ed è pari a 1.808 mPa·s. La temperatura è espressa in °C.

Il legame tra la viscosità del plasma (μ_p) e quella dell'acqua è dato dalla seguente formula:

$$\begin{aligned} \mu_p &= 1.8 \cdot \mu_w & T > 20^\circ\text{C} \\ \mu_p &= \mu_w(1.32 + 0.0024 \cdot T) & T < 20^\circ\text{C} \end{aligned} \quad (2.15)$$

La viscosità del plasma dipende anche dalla concentrazione delle proteine in esso contenute. Questo effetto è modesto per albumina e fibrinogeno, in quanto la prima ha dimensioni assai ridotte e la seconda è presente in concentrazioni molto basse (5%), mentre è assai marcato per la globulina la cui concentrazione è del 40 ÷ 50%.

È possibile utilizzare relazioni matematiche che descrivono il legame tra la viscosità del plasma e la concentrazione di proteine, come ad esempio la relazione di Bayliss [15]:

$$\mu_p = \mu_w \cdot \frac{1}{1-k \cdot c} \quad (2.16)$$

dove c è la concentrazione proteica e k è la costante caratteristica della specifica proteina.

Tra i componenti corpuscolari, solo i globuli rossi contribuiscono in maniera non trascurabile a definire la reologia del sangue.

Una delle relazioni più semplici che lega la viscosità del sangue all'ematocrito è la formula di Bull:

$$\mu_s = \mu_p(1 + 2.5Ht) \quad (2.17)$$

dove μ_s è la viscosità del sangue, μ_p la viscosità del plasma e Ht l'ematocrito.

Tale formula può essere modificata prendendo in considerazione la viscosità dei fluidi interni alle particelle (μ_r), secondo la relazione di Taylor:

$$\mu_s = \mu_p \left(1 + 2.5 \frac{\mu_r + 0.4}{\mu_r + 1} \cdot c \right) \quad (2.18)$$

Queste equazioni però non evidenziano il comportamento non-newtoniano del sangue, in quanto non prendono in considerazione la dipendenza della viscosità dallo shear rate.

In figura 2.14 viene mostrato l'andamento della viscosità in funzione di ematocrito e shear rate. Si nota come il comportamento non-newtoniano del sangue è tanto più evidente quanto maggiore è l'ematocrito.

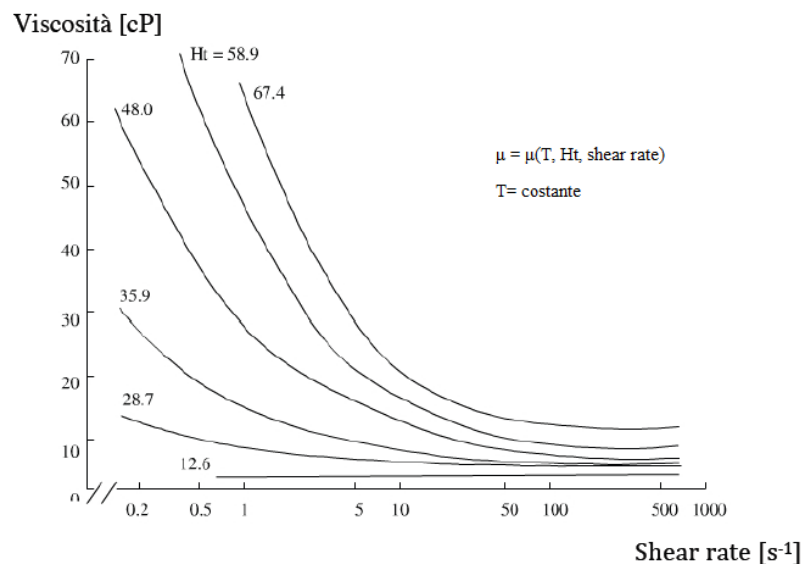


Fig. 2.14 Andamento della viscosità in funzione dello shear rate a diversi valori di ematocrito (l'asse delle ascisse è in scala logaritmica)

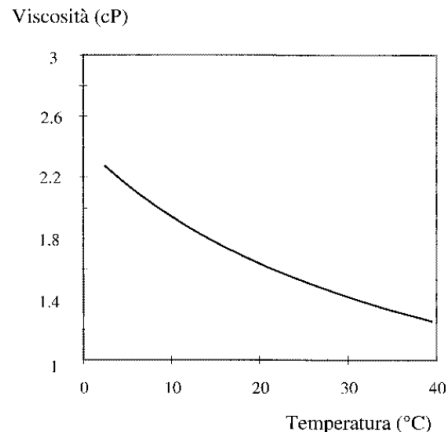


Fig. 2.15 Andamento della viscosità in funzione della temperatura (a parità di ematocrito e shear rate)

Il comportamento non-newtoniano del sangue a basso gradiente di velocità, può essere descritto mediante modelli fenomenologici ricavati da studi relativi a fluidi industriali (inchiostri, sostanze plastiche).

Una relazione comunemente usata è quella di Casson:

$$\begin{aligned} \sqrt{\tau} &= \sqrt{\tau_0} + \sqrt{\mu_c \cdot \dot{\gamma}} & \tau &\geq \tau_0 \\ \dot{\gamma} &= 0 & \tau &\leq \tau_0 \end{aligned} \quad (2.19)$$

dove:

- τ_0 è lo *yield stress* ovvero lo sforzo di taglio necessario per mettere in movimento il fluido. Dipende dalla composizione macromolecolare del sangue, ma è indipendente dalla temperatura nell'intervallo 10÷37°C [16]. Tramite questa grandezza, il modello di Casson prende in considerazione il comportamento del sangue a bassi shear rate, in corrispondenza dei quali il fluido si comporta come un materiale solido con la formazione di aggregati cellulari, come detto in precedenza. τ_0 può essere calcolato secondo la relazione

$$\tau_0 = (H_T - 0.017) \cdot (1.55 \cdot C_f + 0.76)^2 \quad (2.20)$$

dove H_T è l'ematocrito e C_f è la concentrazione di fibrinogeno nel plasma misurata in g/100ml. In genere il valore di C_f è compreso tra 200 e 400 mg/100ml. Per H_T inferiori a 0.017 τ_0 assume valore nullo.

- μ_c è la *viscosità di Casson*, è una costante che dipende dall'ematocrito e dalla viscosità del plasma secondo la relazione semi-empirica

$$\mu_c = \mu_p \left(1 + \frac{5}{2} H_T + 7.35 H_T^2 \right) \quad (2.21)$$

- $\dot{\gamma}$ è lo shear rate

In figura 2.16 e 2.17 è mostrato l'andamento dello sforzo di taglio in funzione dello shear rate secondo il modello di Casson.

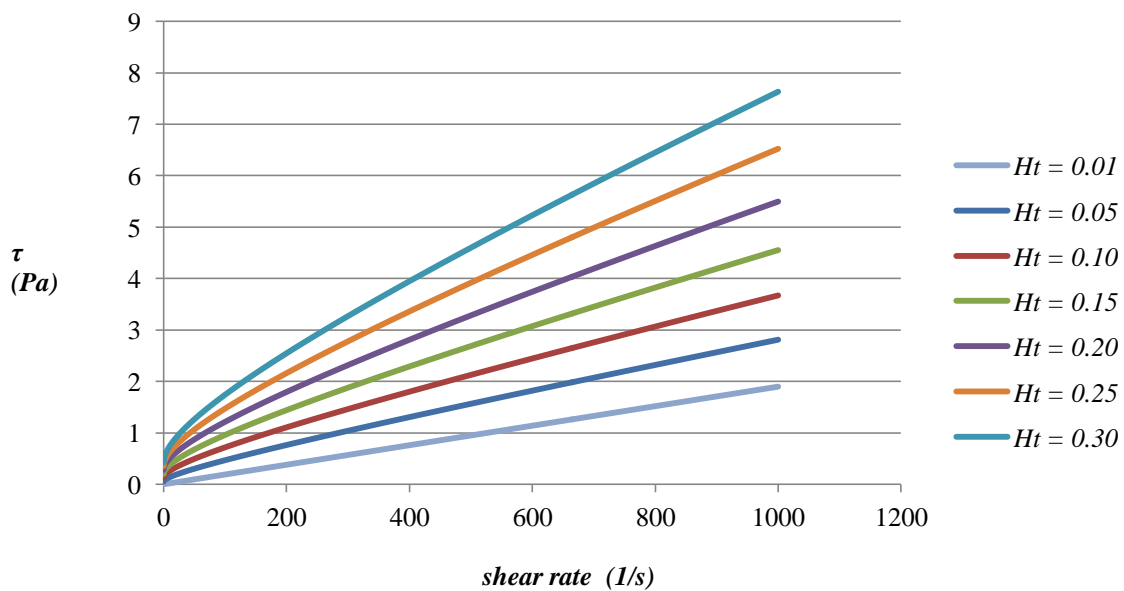


Fig. 2.16 Diagramma di Casson

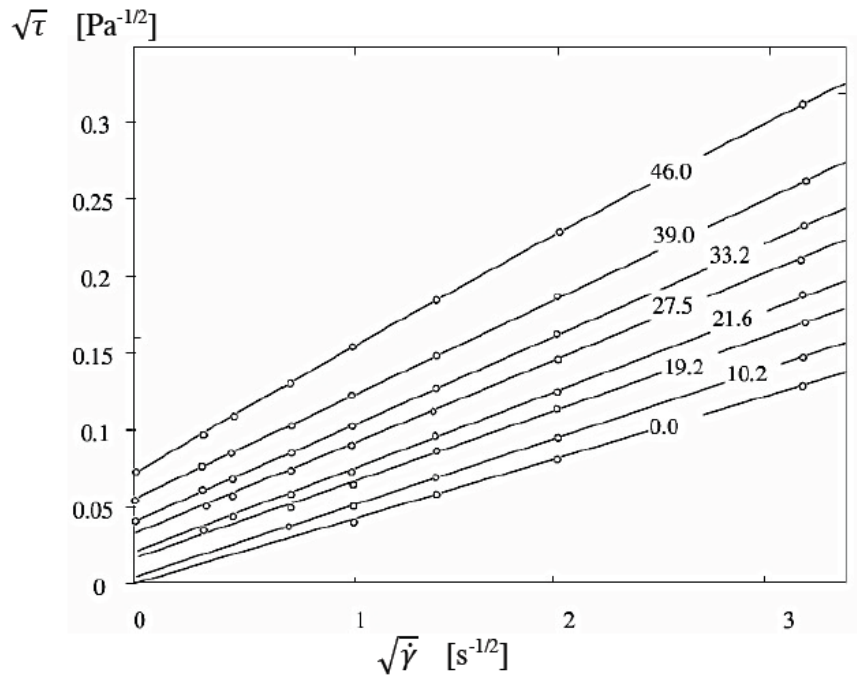


Fig. 2.17 Diagramma di Casson per bassi valori di shear rate

Dal primo diagramma (Fig. 2.16) si osserva come per bassi valori di ematocrito (inferiori a 8.25% [2]) il comportamento del sangue sia assimilabile a quello di un fluido newtoniano. Per valori di ematocrito superiori si possono distinguere due zone: la prima, caratterizzata da bassi valori di shear rate, è indicativa di un legame non lineare tra le due grandezze caratteristiche; la seconda, per shear rate superiori, mostra invece un legame lineare. All'aumentare dell'ematocrito si osserva che l'estensione della regione lineare diminuisce [16].

Dal secondo diagramma (Fig. 2.17) si evince con maggior chiarezza come all'aumentare dell'ematocrito aumenti la viscosità di Casson (sotto radice quadrata), ovvero il coefficiente angolare della curva in ogni punto, e lo yield stress necessario per porre in movimento il fluido. Tutto questo in accordo con le formule riportate in precedenza.

2.8 La microcircolazione

Quando il sangue scorre in condotti il cui diametro è comparabile con quello dei globuli rossi ($<100\mu\text{m}$), non lo si può ritenere un fluido omogeneo. A livello di micro-scala si ricorre alla trattazione adottata per i fluidi bifase: si distingue una fase liquida portante, il plasma, e una fase solida e deformabile costituita dagli elementi figurati.

Nella microcircolazione, così come nei grandi vasi per bassi valori di shear rate, il sangue perde il suo comportamento newtoniano. Per caratterizzarlo nel suo complesso si definisce una *viscosità apparente* (μ_{app}): viscosità del sangue supponendo che esso possa essere trattato come un fluido omogeneo newtoniano.

Ad esempio, considerando il moto laminare in un condotto orizzontale cilindrico, con pareti rigide, in regime stazionario, è valida la legge di Poiseuille

$$\Delta P = \frac{128\mu L}{\pi D^4} Q \quad (2.22)$$

da cui

$$\mu_{app} = \frac{\pi D^4 \Delta P}{128 Q L} \quad (2.23)$$

dove D è il diametro del condotto, ΔP la differenza di pressione tra ingresso e uscita, Q la portata e L la lunghezza.

Dividendo la viscosità apparente per la viscosità del plasma (μ_0), si definisce la viscosità relativa

$$\mu_r = \frac{\mu_{app}}{\mu_0} \quad (2.24)$$

Il concetto di viscosità apparente può essere esteso a qualsiasi regime di flusso, anche turbolento, se essa viene calcolata da una formula nota valida per un fluido omogeneo e newtoniano.

Il concetto di viscosità relativa può essere esteso a qualsiasi sistema di flusso, a patto di poter misurare portata e pressione, anche se la geometria non è nota.

La viscosità apparente e la viscosità relativa non sono proprietà intrinseche del sangue: entrambe dipendono dall'ematocrito, dal livello di aggregazione degli eritrociti e dalla geometria del condotto [2-5].

2.8.1 Effetto Fahraeus-Lindqvist

Nella microcircolazione, per diametri inferiori ai 200 μm , ad una diminuzione del diametro del condotto è associata una riduzione della viscosità apparente (Fig. 2.18).

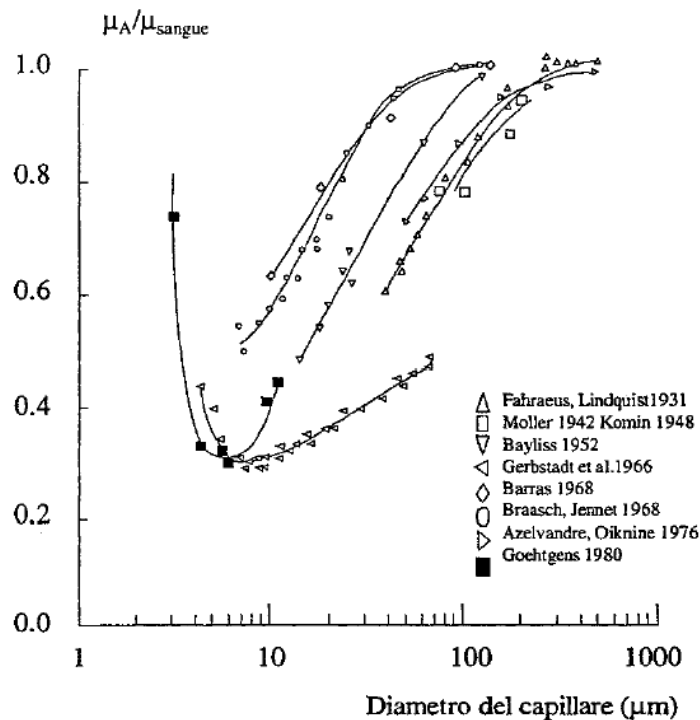


Fig. 2.18 Andamento della viscosità apparente rispetto alla viscosità del sangue in funzione del diametro del capillare, per diverse prove sperimentali (l'asse delle ascisse è in scala logaritmica).

Il fatto che la viscosità apparente diventi minore della viscosità del sangue, è causato dalla disposizione degli eritrociti lungo l'asse del condotto e dalla disposizione del plasma in prossimità delle pareti.

Ciascun globulo è soggetto a campi di velocità diversi alle due estremità (a parità di portata se diminuisce il diametro del condotto aumenta la velocità e lo shear rate), questo porta la

cellula a porsi con l'asse maggiore nella direzione del flusso e a spostarsi verso il centro del capillare.

Nello stesso momento, il plasma forma un meato che funge da lubrificante per lo scorrimento delle cellule, riducendo l'attrito quindi la resistenza allo scorrimento.

Lo spessore di questo strato dipende dal valore di ematocrito, dal diametro del condotto e dal regime di moto: diminuisce all'aumentare dell'ematocrito, diminuisce al diminuire del diametro.

La viscosità apparente raggiunge un minimo per valori di diametro compresi tra 5 e 7 μm , valori corrispondenti al diametro dei capillari sanguigni.

Per diametri inferiori, la viscosità apparente aumenta: gli eritrociti hanno dimensioni superiori rispetto alla sezione del condotto, la resistenza opposta è alta, perciò sono necessari elevati gradienti pressori per deformare il globulo e garantire la continuità del flusso [2-5].

2.8.2 Effetto Fahraeus.

Fissato un certo valore di ematocrito, facendo fluire del sangue da una riserva di monte ad una riserva di valle attraverso un capillare si osservano i seguenti fenomeni [2-5]:

- l'ematocrito nel condotto (H_T) è inferiore rispetto a quello nella riserva a monte (H_F).

Questo è dovuto al fatto che gli eritrociti possono essere rallentati durante la fase d'ingresso nel capillare a causa degli urti con le pareti in corrispondenza dell'imbocco, mentre il plasma procede con minori problemi.

Questa differenza è tanto più accentuata quanto più piccolo è il diametro del capillare (Fig. 2.19);

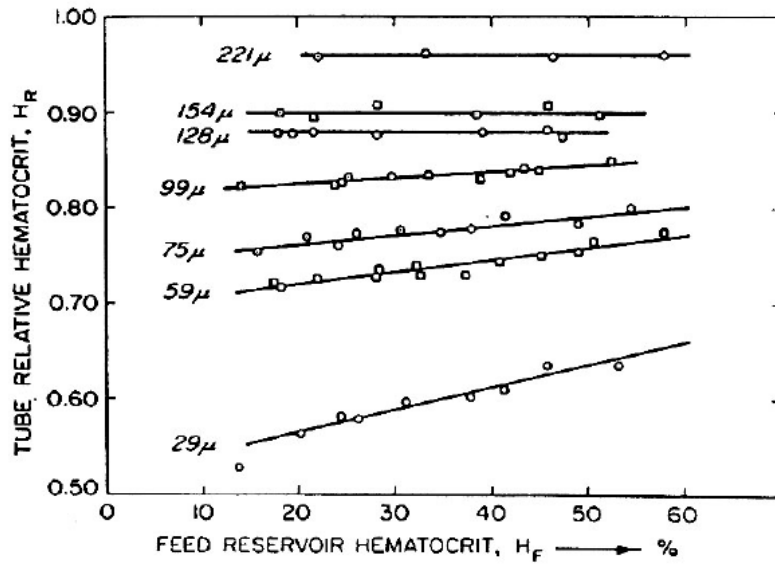


Fig. 2.19 Andamento dell'ematocrito relativo $H_R = H_T/H_F$ in funzione dell'ematocrito nella riserva a monte (H_F), al variare del diametro del capillare

- in condizioni stazionarie, l'ematocrito nella riserva a monte è uguale all'ematocrito nella riserva a valle (H_D);
- per condotti con diametro inferiore a 500 μm , il valore di ematocrito nel capillare è minore di quello nella riserva a valle (Fig. 2.20).

Questo è dovuto al fatto che i globuli rossi non sono distribuiti uniformemente nella sezione del capillare ma sono, invece, accumulati lungo l'asse del condotto. Ne consegue un valore di ematocrito maggiore nella porzione centrale del capillare rispetto alla zona prossima alla parete. Essendo il profilo di velocità parabolico, i filetti fluidi della parte centrale avranno una velocità maggiore, quindi nella riserva a valle arriverà sangue con un valore di ematocrito più alto.

H_T è definito come il rapporto tra il volume dei globuli rossi nel condotto e il volume dell'intero capillare. H_D è il rapporto tra la portata di globuli rossi e la portata del sangue nel suo complesso.

$$H_{volume} = \frac{\int_0^R H(r)\pi r dr}{V} \quad H_{portata} = \frac{\int_0^R H(r)v(r)\pi r dr}{Q} \quad (2.25)$$

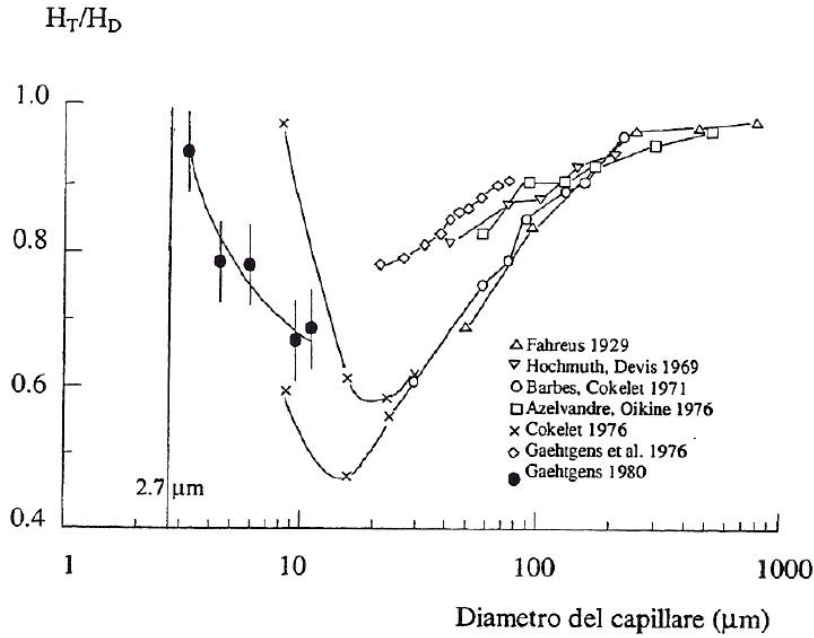


Fig. 2.20 Andamento del rapporto H_T/H_D al variare del diametro del condotto, per diverse prove sperimentali. $H_F = 40\%$ (l'asse delle ascisse è in scala logaritmica).

2.8.3 Cell-depletion layer

Lo strato di plasma che si forma alla parete di condotti di dimensioni micrometriche, può essere analizzato mediante numerose teorie fluidodinamiche, tutte di tipo fenomenologico. Una di esse è il *modello a cilindri coassiali*, applicabile a due fluidi immiscibili newtoniani che scorrono in un condotto circolare di raggio R . Questa trattazione consente di calcolare analiticamente la viscosità apparente del sangue. Si considera uno strato limite di plasma di spessore δ e viscosità μ_p , mentre nella restante parte di capillare scorre sangue con viscosità μ_s . Nell'ipotesi di flusso alla Poiseuille, le velocità di plasma (v_p) e sangue (v_s) sono date dalle seguenti relazioni:

$$v_s = -\frac{1}{4} \frac{\Delta p}{L} \left(\frac{r^2 - (R-\delta)^2}{\mu_s} + \frac{(R-\delta)^2 - R^2}{\mu_p} \right) \quad 0 < r < R-\delta$$

$$v_p = -\frac{1}{4\mu_p} \frac{\Delta p}{L} (r^2 - R^2) \quad R-\delta < r < R \quad (2.26)$$

Mentre la viscosità apparente è calcolata come

$$\mu_{app} = \mu_p \left[1 - \left(1 - \frac{\delta}{R} \right)^4 \cdot \left(1 - \frac{\mu_p}{\mu_s} \right) \right]^{-1} \quad (2.27)$$

Dalla relazione precedente si evince come, in assenza di strato alla parete ($\delta = 0$), la viscosità apparente è uguale a quella del sangue.

All'aumentare del rapporto δ/R , la viscosità apparente diminuisce in accordo con la fase di decrescita che si riscontra nella curva di Fahraeus-Lindqvist: al diminuire del diametro del capillare la viscosità diminuisce.

Da osservazioni sperimentali risulta che anche lo spessore dello strato limite diminuisce al diminuire del diametro del capillare, oltre che all'aumentare dell'ematocrito.

Quindi, in questo caso, la diminuzione di δ è sensibilmente minore rispetto alla diminuzione del diametro del capillare, perciò il rapporto tra spessore e raggio aumenta al ridursi di quest'ultimo.

La presenza di questo strato influenza gli sforzi di taglio alla parete dipendenti dalla viscosità e dallo shear rate in prossimità della stessa.

È noto inoltre il fatto che lo spessore dello strato aumenta all'aumentare del valore di shear rate.

A livello sperimentale, lo spessore del layer può essere determinato attraverso l'acquisizione, mediante microscopio, di immagini del flusso di sangue nel capillare. Per ogni immagine vengono definite delle linee d'analisi perpendicolari all'asse del vaso ed equidistanti tra loro.

In corrispondenza di ciascuna linea viene estrapolato il profilo d'intensità dei livelli di grigio, da cui è possibile determinare la distanza tra le pareti del vaso e il "core" di globuli rossi. Dai dati acquisiti si definisce infine un valore medio dello spessore del CDL [17].

3. TECNICHE D'INCAPSULAMENTO

3.1 Introduzione

Lo sviluppo di sistemi per la veicolazione di farmaci all'interno del corpo umano (drug delivery systems) è uno dei principali campi di ricerca di aziende e università di tutto il mondo. La complessità del problema è data dall'insieme delle attività interdisciplinari necessarie al raggiungimento dello scopo: realizzazione di nuovi materiali, sviluppo di farmaci sempre più sicuri ed efficaci, messa a punto di tecniche standardizzate [19].

Il ruolo principale dei vettori di farmaci (carrier drug) è quello di trasportare e guidare la sostanza all'interno dell'organismo con tempi e modalità adeguati alla specifica applicazione, in particolare [20]:

- il farmaco deve esercitare la propria azione solo nel sito specifico al fine di minimizzare la quantità di sostanza da incapsulare e limitare il più possibile effetti tossici su organi o tessuti che non dovrebbero essere interessati dalla terapia;
- la scelta del carrier deve essere effettuata per migliorare la farmacocinetica e farmacodinamica delle molecole trasportate in modo da aumentare l'efficacia del processo;
- devono essere garantiti al farmaco tempi di dimezzamento (half-life) ottimali;
- deve essere facilitata l'eliminazione del farmaco all'interno del corpo umano.

Nel corso degli anni sono stati progettati differenti vettori sia naturali che sintetici (Tab. 3.1).

<i>Carrier Drug</i>	<i>Dimensioni [nm]</i>	<i>Morfologia</i>	<i>Half-life</i>
Eritrociti	5000 ÷ 7000	Dischi biconcavi	10 ÷ 15 giorni
PEG-Liposomi	50 ÷ 500	Sfere	3 ÷ 6 ore
Polymersomes	50 ÷ 500	Sfere	10 ÷ 20 ore
Filomicelles	40 x 20000	Filamenti	1 ÷ 3 giorni
Polymer micelles	20 ÷ 30	Sfere	0,1 ÷ 6 ore
Proteine e coniugati	5 ÷ 5000	Sfere irregolari	10 min ÷ 6 ore

Tab. 3.1 Caratteristiche principali dei vettori maggiormente utilizzati per il rilascio di farmaci (gli eritrociti considerati sono quelli di topo) [21]

3.2 Incapsulamento in globuli rossi

Sono numerose le caratteristiche dei globuli rossi che consentono di annoverare queste cellule tra i candidati ideali al trasporto di sostanze [22,23]:

- possibilità di raggiungere ogni distretto corporeo;
- elevata biocompatibilità e assenza di reazioni immunologiche (specialmente nel caso vengano utilizzate cellule autologhe);
- biodegradabilità senza creazione e rilascio di prodotti tossici;
- vita media sufficientemente lunga, comparabile con quella dei globuli non trattati e maggiore rispetto a quella di vettori tradizionali;
- disponibilità di un elevato numero di globuli;
- protezione del farmaco dagli enzimi presenti nel sangue mascherandone la presenza;
- protezione dell'organismo dalla possibile tossicità delle molecole incapsulate;
- possibilità di inglobare alte quantità di molecole grazie all'assenza di nucleo, con conseguente diminuzione del numero di somministrazioni e aumento dell'intervallo di tempo tra due somministrazioni successive;
- possibilità d'incapsulare molecole ad alto peso molecolare come polipeptidi e polisaccaridi;
- il rilascio controllato garantisce una riduzione delle fluttuazioni della concentrazione di sostanza nel torrente ematico.

Nel corso degli ultimi trent'anni sono state studiate e messe a punto tecniche che permettono, ad oggi, di incapsulare molecole di diverso tipo (circa 50 tra enzimi e farmaci) all'interno degli eritrociti. Tali tecniche basano il proprio funzionamento su principi fisici o chimici e garantiscono alte percentuali d'incapsulamento.

Studi recenti hanno dimostrato come sia possibile sfruttare i globuli rossi rendendoli bioreattori, ovvero in grado di attivare farmaci incapsulati nella loro forma inattiva [24].

Per garantire un rilascio mirato in siti specifici, sono state sviluppate tecniche che permettono di guidare i carrier attraverso campi magnetici esterni agenti su nanoparticelle paramagnetiche incapsulate nel globulo rosso insieme al farmaco da rilasciare. Una volta raggiunto l'organo bersaglio, la lisi avviene a seguito dell'applicazione di ultrasuoni.

Tecniche innovative consentono di controllare il profilo di rilascio del farmaco attraverso dei coating sulla membrana del globulo rosso. Variando il numero di strati depositati con tecniche “layer-by-layer”, è possibile ottenere somministrazioni più graduali nel tempo senza alterare né la funzionalità del farmaco né la conformazione del carrier [25].

L'utilizzo di globuli rossi come vettori di farmaci, però, comporta anche degli svantaggi:

- la grande variabilità tra cellule di specie diverse e, all'interno della stessa specie, tra soggetti diversi comporta una più difficile standardizzazione del processo;
- difficoltà di conservazione nel tempo degli eritrociti caricati e rischio di contaminazione biologica durante le varie fasi di manipolazione delle cellule;
- a seguito del trattamento le cellule possono andare incontro a danneggiamento con conseguente aumento della fragilità osmotica e meccanica;
- le procedure d'incapsulamento possono provocare alterazioni morfologiche e strutturali degli eritrociti con conseguente eliminazione rapida da parte del RES (Reticulo Endothelial System, siti di distruzione fisiologica dei globuli rossi), incrementando in questo modo la cinetica di rilascio del farmaco;
- difficile garantire l'assenza di problemi di tossicità causata da un'eccessiva presenza di emoglobina libera nel plasma e dall'accumulo di globuli emolizzati negli organi filtro (reni e milza).

3.3 Tecniche d'incapsulamento tradizionali

Le tecniche d'incapsulamento di cui si ha maggior riscontro in letteratura sfruttano principi fisici e chimici che inducono l'apertura temporanea di pori sulla membrana del globulo. Questo consente la successiva migrazione delle molecole all'interno della cellula per diffusione passiva. La ricerca è tutt'ora in corso per ottimizzare l'efficienza d'incapsulamento, accorciare i tempi di processo e minimizzare i danneggiamenti o le alterazioni della membrana che possono compromettere la funzionalità e la vitalità della cellula stessa.

Per valutare la procedura d'incapsulamento vengono definiti tre indici caratteristici:

- concentrazione di molecole effettivamente incapsulate a fine processo;
- efficienza d'incapsulamento: rapporto tra la concentrazione di molecole incapsulate e la concentrazione di molecole iniziale;
- recupero cellulare: rapporto tra l'ematocrito finale e quello iniziale a pari volume di soluzione.

Per quantificare la distruttività o meno della procedura vengono determinate tre grandezze:

- MCV, volume corpuscolare medio;
- MCH, contenuto medio di emoglobina;
- MCHC, concentrazione media di emoglobina all'interno di ogni singola cellula.

3.3.1 Elettroporazione

L'elettroporazione sfrutta la capacità di campi elettrici transienti ad alta intensità ($1 \div 10$ kV/cm) e di breve durata ($20 \div 160$ μ s) di provocare un momentaneo incremento della permeabilità della membrana del globulo rosso quando questo è posto in un'adeguata soluzione isotonica. Se si lavora ad una temperatura di 0°C è possibile mantenere tale stato per un tempo sufficiente da consentire la diffusione del farmaco ($30 \div 60$ minuti). Lo stato originale viene ripristinato incubando le cellule a 37°C in una soluzione osmoticamente stabile. In questo modo le molecole diffuse vengono intrappolate all'interno dell'eritrocita con un'efficienza di circa il 35%. In figura 3.1 viene schematizzato l'intero processo.

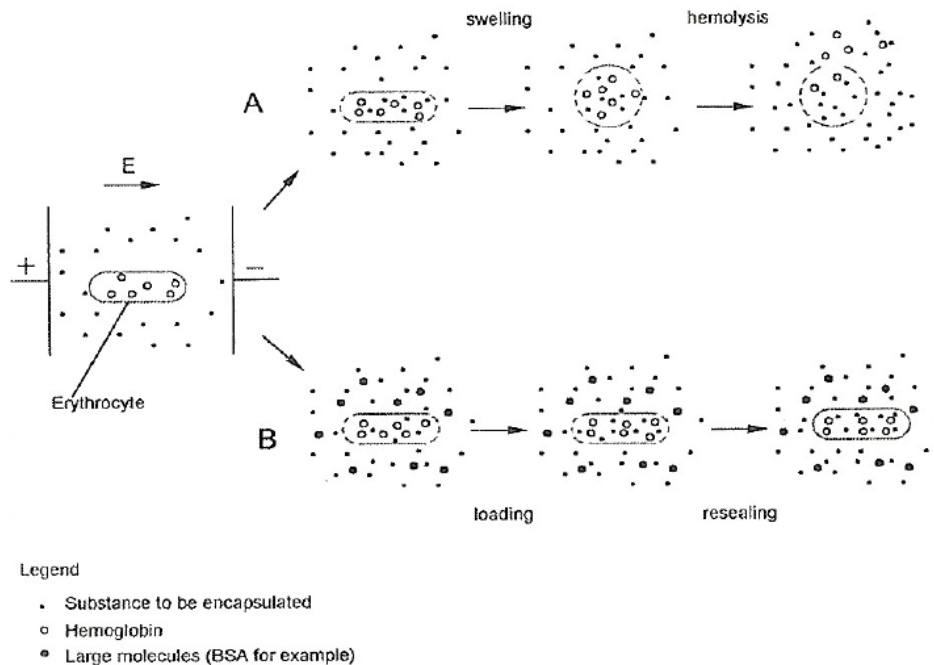


Fig. 3.1 Fasi del processo d'incapsulamento per elettroporazione

La presenza di molecole con elevato peso molecolare riesce a bilanciare la pressione osmotica delle proteine citoplasmatiche evitando la lisi della membrana dovuta al richiamo di acqua (percorso B, Fig. 3.1). Questa tecnica permette di evitare alterazioni dell'eritrocita che risulta quindi indistinguibile da un normale globulo rosso una volta reinserito nel torrente ematico. Il processo necessita tuttavia di apparecchiature specifiche e permette di trattare solo piccole quantità di cellule [26].

3.3.2 Endocitosi indotta farmacologicamente

L'endocitosi è un processo fisiologico che permette alle cellule di inglobare piccole quantità di fluido extracellulare. Sotto opportuni stimoli la membrana cellulare crea una rientranza, nel tempo essa diventa sempre più pronunciata fino a dar vita ad una vera e propria vescicola quando i due lembi opposti si toccano e si fondono. Il fluido e le eventuali proteine, ioni o particelle che si trovano disciolte, così come qualunque sostanza presente in quel momento nella parte coinvolta dal processo, rimangono intrappolate all'interno della cellula.

Nel caso dei globuli rossi, il fenomeno è naturalmente presente solo per gli eritrociti appena formati, mentre può essere indotto chimicamente nelle cellule adulte portando a contatto due porzioni adiacenti della membrana. Farmaci come pravastatin sono in grado di indurre la formazione di vescicole endocitiche con rese fino al 94% [27].

Questa tecnica presenta il vantaggio di evitare lisi cellulare e perdita di sostanze citoplasmatiche, tuttavia le condizioni di lavoro devono essere rigidamente controllate affinché il fenomeno sia efficace: la temperatura ottimale è attorno ai 37°C, al di sotto dei 23°C e al di sopra dei 37°C non si osserva formazione di vescicole; il pH deve essere mantenuto tra 7.9 e 8.1; la capacità di incapsulamento aumenta all'aumentare del tempo e della concentrazione del farmaco [23].

3.3.3 Metodi basati su processi osmotici

Tutti i metodi appartenenti a questa categoria sfruttano i processi osmotici che possono svilupparsi a cavallo della membrana cellulare. A causa della differenza di concentrazione tra il fluido citoplasmatico e la soluzione extracellulare si crea un flusso osmotico che tende a ristabilire l'equilibrio. Una soluzione ipotonica, ad esempio, può indurre l'ingresso di acqua per osmosi all'interno dei globuli rossi i quali aumentano di volume. In questo modo la membrana viene sottoposta a trazione, i pori si aprono e consentono l'ingresso delle molecole da incapsulare presenti in soluzione. Una volta ristabilito l'equilibrio osmotico i pori si richiudono e il farmaco rimane intrappolato all'interno dell'eritrocita che assume di nuovo la sua conformazione originaria.

3.3.3.1 Metodo dell'impulso osmotico

Questa tecnica si basa sull'applicazione di stress osmotici di breve durata ma di elevata intensità. Per creare il gradiente osmotico necessario a causare l'apertura dei pori viene generalmente usato dimetilsolfossido (DMSO).

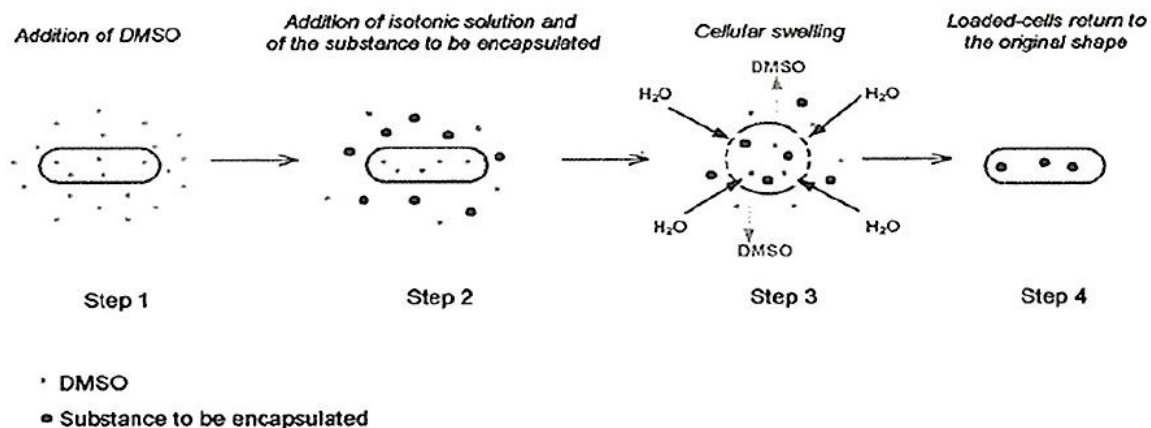


Fig. 3.2 Incapsulamento per impulso osmotico

Il processo è diviso in 4 fasi (Fig. 3.2). Inizialmente (step 1) gli eritrociti vengono sospesi in una soluzione isotonica di DMSO per ottenere una pari concentrazione a cavallo della membrana (circa 1500 mOsm per 8% di DMSO). In seguito la soluzione viene diluita con un tampone isotonico contenente il farmaco da incapsulare (step 2): la concentrazione di DMSO diminuisce bruscamente nel fluido extracellulare creando un forte gradiente osmotico a cavallo della membrana. Per ristabilire l'equilibrio si generano due flussi opposti, uno di DMSO in uscita dalla cellula e uno di acqua in entrata che provoca rigonfiamento del globulo rosso. Condizione fondamentale per garantire la buona riuscita del processo è che il flusso di DMSO sia molto più lento del flusso di acqua (condizione realistica se si considera l'elevata permeabilità della membrana all'acqua). A questo punto il farmaco può diffondere attraverso i pori che si sono creati sullo stroma (step 3). Quando si raggiunge l'equilibrio e il flusso di DMSO termina, il globulo rosso torna alla sua configurazione iniziale e il farmaco rimane intrappolato all'interno (step 4). Questo metodo richiede tempi molto lunghi e permette di trattare solo piccoli volumi di globuli rossi, tuttavia non causa alterazioni alle cellule che risultano identiche a quelle non trattate [28].

3.3.3.2 Emolisi ipotonica

L'eritrocita sospeso in una soluzione ipotonica è caratterizzato da una differenza di pressione osmotica tra i compartimenti a cavallo della membrana. Questo provoca

l'instaurarsi di un rapido flusso d'acqua verso l'interno del globulo rosso e di un lento efflusso salino. Come diretta conseguenza l'eritrocita assume forma sferica e la membrana viene posta in trazione. La formazione di pori (diametro di circa $200 \div 500 \text{ \AA}$) permette la diffusione di molecole dall'esterno all'interno della cellula e viceversa, a seconda dei gradienti di concentrazione presenti. Ripristinando le condizioni isotoniche l'eritrocita torna alla normale configurazione di disco biconcavo, i pori si richiudono e il farmaco rimane intrappolato all'interno della cellula [28,29] (Fig. 3.3).

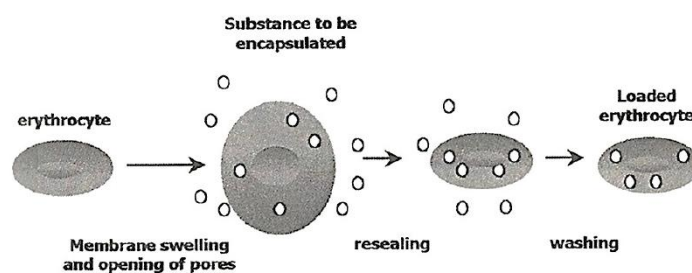


Fig. 3.3 Incapsulamento per emolisi ipotonica

A seconda della procedura utilizzata si distinguono tre tipologie diverse di emolisi ipotonica.

Diluizione ipotonica

Per ogni volume di eritrociti vengono aggiunti dai 2 ai 20 volumi di acqua o soluzione ipotonica contenente la molecola da incapsulare. La soluzione viene lasciata a $0 \text{ } ^\circ\text{C}$ per almeno 5 minuti. Durante questo tempo avviene l'incapsulamento. Questa procedura è semplice e veloce, adatta a trattare molecole a basso peso molecolare (fino a 130 kDa). Può provocare una riduzione del contenuto cellulare, in particolare di emoglobina, con conseguente perdita di funzionalità della cellula.

L'efficienza d'incapsulamento è attorno al 30% e viene garantito un recupero cellulare tra l'86 e il 100%. I parametri MCV, MCH, MCHC, hanno valori paragonabili a quelli di eritrociti non caricati [34,35].

Prerigonfiamento con diluizione

Questa tecnica consente di limitare la perdita di contenuti cellulari. Grazie ad un procedimento che si sviluppa in due fasi si riduce notevolmente il numero di cellule coinvolte in processi di lisi (Fig. 3.4).

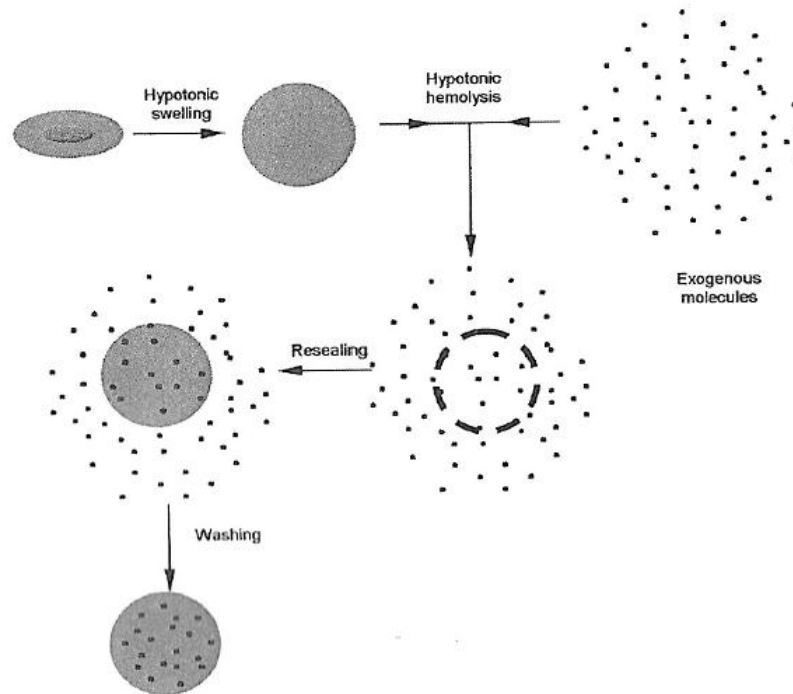


Fig. 3.4 Prerigonfiamento con diluizione

Inizialmente viene indotto un aumento di volume cellulare del 150% mediante sospensione degli eritrociti in una soluzione leggermente ipotonica di PBS. Dopo 5 minuti a 0°C le cellule vengono recuperate mediante lenta centrifugazione. La procedura viene ripetuta, a 0°C per 10 minuti, introducendo il composto da incapsulare ed aumentando la pressione osmotica della soluzione. L'efficienza d'incapsulamento che si ottiene con questo metodo è compresa tra il 30% e il 40%, con incrementi significativi nel caso di pretrattamento dei globuli rossi con glutaraldeide. Il recupero cellulare varia tra il 60 e l'80%. Parametri che influenzano la resa del processo sono il pH, la temperatura di lavoro, il volume di eritrociti e di molecole da incapsulare e la composizione della soluzione [22,30].

Dialisi ipotonica

Gli eritrociti, con un ematocrito compreso tra il 5% e l'80%, vengono posti in una sacca per dialisi insieme ad una soluzione tampone isotonica contenente la sostanza da incapsulare. La sacca viene riempita di aria in modo da occupare un volume pari a circa il 25% del totale, viene sigillata e immersa in una soluzione ipotonica in continuo rimescolamento (50 volumi di soluzione per ogni volume di globuli rossi). Il tutto viene mantenuto ad una temperatura di circa 4°C. Il processo di dialisi necessita di un tempo che va dai 20 ai 180 minuti, al termine del quale è ristabilita l'isotonicità e gli eritrociti vengono fatti riposare per 30 - 60 minuti a 37°C in modo da avere richiusura dei pori [23,38].

A seconda della dimensione della molecola da incapsulare possono essere attuate strategie diverse: se il peso molecolare è maggiore della soglia di filtrazione della membrana, la molecola deve essere aggiunta prima della dialisi all'interno della sacca; in caso contrario, è necessario inserirla prima o dopo la dialisi nella soluzione tampone esterna alla sacca [31].

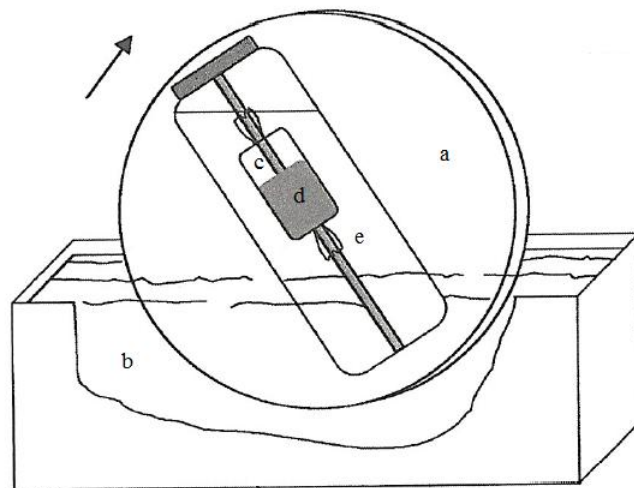


Fig. 3.5 Apparecchiatura per dialisi ipotonica: si distingue l'elemento rotante (a), un bagno di acqua e ghiaccio (b), la zona occupata da aria all'interno della sacca per dialisi (c), la sospensione di eritrociti in soluzione tampone isotonica contenente le molecole da incapsulare (d), la soluzione ipotonica esterna (e)

L'efficienza d'incapsulamento è compresa tra il 31% e il 48%: tanto maggiore quanto più alto è il valore di ematocrito e quanto minore è il peso molecolare della molecola da incapsulare; è inoltre dipendente dalla capacità di provocare il minor numero possibile di alterazioni morfologico-funzionali [25,32,36].

Il recupero cellulare varia tra il 60 e il 90% a seconda dei parametri di lavoro [36,37].

Risultano importanti per l'ottimizzazione del processo il tempo di dialisi, l'osmolarità della soluzione dializzante e quella della soluzione con la quale vengono lavati gli eritrociti alla fine del processo.

Per tale procedura i parametri MCV, MCH, MCHC, hanno valori paragonabili a quelli di eritrociti non caricati [36,37].

Il vantaggio principale di questa tecnica è l'assenza di alterazioni strutturali nella membrana cellulare [33]. In questo modo, la vita media e le proprietà delle cellule risultano paragonabili a quelle di eritrociti non trattati.

3.4 Incapsulamento mediante sforzi di taglio

Numerosi studi hanno dimostrato la possibilità d'incapsulare molecole all'interno di globuli rossi sollecitati meccanicamente [2-5]. A differenza delle tecniche tradizionali basate su processi fisico-chimici, gli eritrociti subiscono l'azione degli sforzi tangenziali che nascono all'interno di un fluido che scorre in un condotto. Tali sforzi possono indurre l'apertura di pori sulla membrana cellulare e consentire la diffusione di molecole all'interno del globulo. Terminata la sollecitazione le porosità spariscono e le sostanze incapsulate rimangono racchiuse all'interno.

Rispetto alle tecniche convenzionali questa procedura risulterebbe più semplice nella realizzazione e permetterebbe il trattamento di volumi di sangue maggiori. È pensabile, inoltre, sfruttare tale tecnica per la realizzazione di un dispositivo in linea con il paziente.

Uno studio recente in cui è stata applicata questa metodologia, è stata dimostrata la possibilità d'incapsulare molecole di destrano all'interno di eritrociti sospesi in una soluzione fisiologica [2]. Il fluido veniva fatto scorrere in un capillare a sezione quadrata di

lato 50 μm e lunghezza 58.5 mm. Un dispositivo per la micro-PIV (micro-Particle Image Velocimetry) rilevava il profilo di velocità. La micro-PIV è una tecnica di analisi che sfrutta un sistema ottico per eseguire misurazioni fluidodinamiche. In genere è costituita da una camera CCD, un microscopio epifluorescente invertito, due laser Nd:YAG e particelle traccianti in polistirene marcate con dye fluorescenti da aggiungere al fluido. Una volta ottenuto il profilo di velocità veniva calcolata la distribuzione degli sforzi di taglio. Le prove erano ripetute variando portata ed ematocrito. Scelta la condizione fluidodinamica più favorevole si procedeva con prove d'incapsulamento. La sospensione di globuli rossi e fisiologica veniva fatta scorrere nuovamente nello stesso capillare con l'aggiunta di molecole di destrano. Al termine di ciascuna prova, mediante conta cellulare in camera di Burker, si rilevava il numero di globuli contenenti le molecole probanti e con uno spettrofluorimetro si stimava la loro concentrazione all'intero delle cellule. Queste analisi, però, hanno consentito di identificare solo la presenza di molecole probanti all'interno degli eritrociti, senza riuscire a determinare effettivamente il numero dei globuli interessati e nemmeno la concentrazione presente in ogni cellula.

Si comprende come non sia possibile, ad oggi, stabilire se questa metodologia d'incapsulamento sia più vantaggiosa rispetto a quelle convenzionali. La ricerca in questo ambito è in corso e questa tesi ne rappresenta un contributo.

3.5 Applicazioni terapeutiche

I primi sistemi per il rilascio controllato di farmaci tramite globuli rossi risalgono agli anni settanta del secolo scorso. Progressivamente l'interesse in questo ambito è cresciuto dando luogo a innumerevoli studi e linee di ricerca. La sperimentazione ha riguardato non solo l'incapsulamento di farmaci come antibiotici, steroidi, antivirali, ma anche di proteine, enzimi e materiale genetico.

Le applicazioni terapeutiche su cui è stata ed è tuttora focalizzata maggiormente l'attenzione sono diverse:

- cura di tumori: incapsulamento di chemioterapici e alterazione degli eritrociti per garantire il riconoscimento degli organi colpiti dalla malattia;

- trasporto di farmaci nella forma inattiva rilasciati a seguito di lisi cellulare e attivati da enzimi presenti nel sito d'interesse;
- attivazione del farmaco all'interno dell'eritrocita (funzione di bioreattore);
- incapsulamento di enzimi per la cura di patologie legate alla carenza degli stessi o per degradare composti nocivi dovuti ad intossicazioni di varia natura;
- incapsulamento di vaccini per evitare iniezioni multiple e diminuire le dosi utilizzate;
- incremento della capacità di trasporto di ossigeno mediante incapsulamento di regolatori allosterici dell'emoglobina;
- incapsulamento di agenti di contrasto per risonanza magnetica (MRI).

4. MODELLO COMPUTAZIONALE

4.1 Introduzione

La fluidodinamica computazionale (CFD, *Computational Fluid Dynamics*) è una tecnica numerica utilizzata nei più svariati ambiti industriali e di ricerca, che consente la risoluzione di problemi di tipo fluidodinamico. Sono numerosi i software commerciali che permettono di comprendere, predire e progettare l'azione di fluidi in sistemi aperti o chiusi. Come parte di un'indagine più ampia, le simulazioni numeriche forniscono una stima accurata delle grandezze che caratterizzano il flusso e l'interazione del flusso con l'ambiente circostante.

Lo studio dei processi di incapsulamento per mezzo di sollecitazioni meccaniche richiede un'analisi preliminare della fluidodinamica nei condotti. È necessario simulare il comportamento del sangue all'interno di micro-capillari prima di procedere alla messa in opera di set-up sperimentali.

Studi precedenti hanno dimostrato la possibilità di incapsulare molecole all'interno di globuli rossi sollecitati meccanicamente [2-5]. L'azione degli sforzi di taglio induce l'apertura di pori temporanei sulla membrana cellulare, consentendo l'ingresso per diffusione delle sostanze desiderate.

Terminata la sollecitazione i pori si richiudono e i globuli possono diventare carrier per il trasporto di farmaci in ogni parte del corpo.

L'obiettivo principale è quindi la valutazione della distribuzione e dell'entità degli sforzi di taglio per la scelta delle dimensioni opportune del capillare. A partire da una geometria di riferimento è necessario individuare la combinazione ottimale delle altre grandezze caratteristiche quali portata, perdite di carico ed ematocrito.

Il modello computazionale è stato realizzato usando il software COMSOL Multiphysics 4.2a (COMSOL AB, Stockholm, Sweden).

4.2 Geometria

La geometria iniziale del modello riproduce un capillare di dimensioni micrometriche con area della sezione trasversale quadrata.

La scelta di lavorare su scala micrometrica deriva dalla volontà di realizzare un dispositivo d'incapsulamento costituito da più canali in parallelo e in grado di processare portate di circa 250÷500 ml/min. Il valore di tali portate, tipico di procedure di circolazione extracorporea, è stato scelto avendo come obiettivo finale un'applicazione in linea con il paziente.

Per semplicità e consci del fatto che il comportamento del fluido si riproduce identico in ciascun condotto, l'analisi computazionale viene eseguita prendendo in esame un singolo capillare. Di seguito vengono riportate le dimensioni.

<i>Lunghezza</i>	<i>Altezza</i>	<i>Profondità</i>
58.5 mm	50 μm	50 μm

Tab. 4.1 Dimensioni capillare

È stato dimostrato sperimentalmente che un condotto a sezione quadrata con tali dimensioni garantisce la possibilità di incapsulare molecole all'interno di eritrociti [2]. La scelta di questa geometria era stata effettuata sulla base della disponibilità commerciale e della possibilità di determinare in modo efficace i profili di velocità tramite l'osservazione del moto al microscopio. L'ingresso e l'uscita del fluido avviene attraverso due aperture circolari di raggio 25 μm poste alle estremità del capillare (Fig. 4.1).

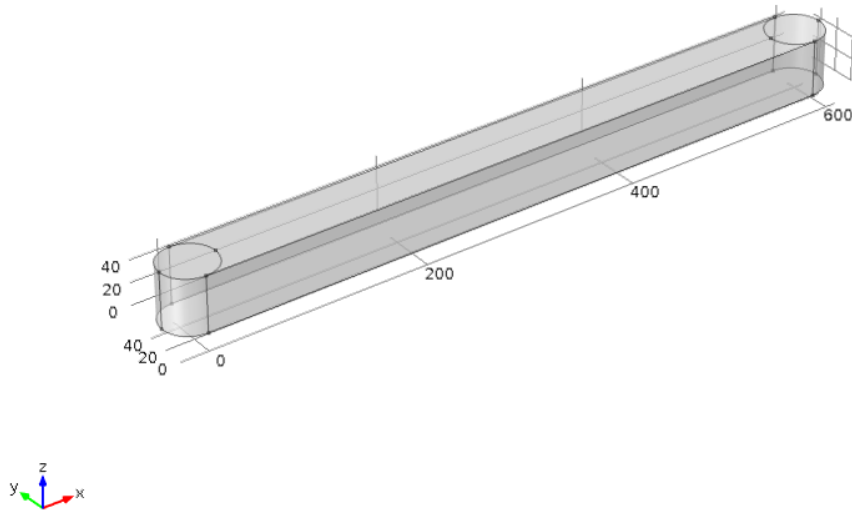


Fig. 4.1 Modello geometrico del capillare (per rendere comprensibile la geometria del condotto la lunghezza è stata ridotta di 100 volte rispetto al valore reale)

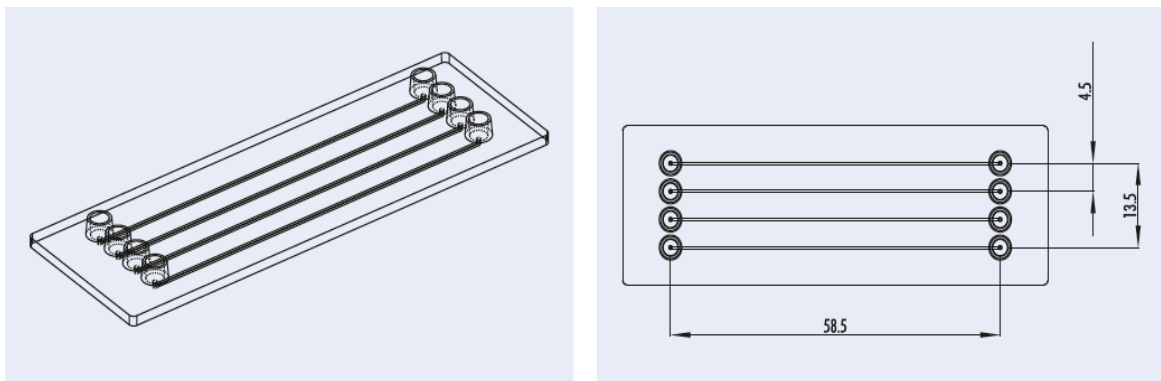


Fig. 4.2 Chip commerciale composto da quattro canali a sezione quadrata e mini Luer di connessione in ingresso e uscita. Le dimensioni riportate sono in mm (microfluidic ChipShop GmbH, Jena, Germany)

Si concentra l'attenzione sul solo capillare escludendo le altre parti del set-up sperimentale. Nei tubi di collegamento con la pompa a siringa, così come nei connettori, gli sforzi di taglio sono trascurabili rispetto a quelli nel condotto [2].

4.3 Materiali

Molto spesso nelle prove sperimentali in cui si sollecitano globuli rossi non viene utilizzato sangue intero, ma una sospensione di eritrociti in PBS. Il PBS (phosphate buffer saline) è una soluzione salina comunemente usata in ambito biologico che in presenza di globuli rossi garantisce isotonicità.

Il software richiede la definizione dei materiali che costituiscono il fluido di lavoro. Globuli rossi e PBS vengono implementati fornendo le grandezze caratteristiche di densità e viscosità (Tab. 4.2).

	<i>Densità</i>	<i>Viscosità</i>
<i>PBS</i>	1000 kg/m ³	1.05 · 10 ⁻³ Pa·s
<i>RBC</i>	1090 kg/m ³	/

Tab. 4.2 Valori di densità e viscosità per PBS (phosphate buffer saline) e RBC (red blood cell)

Ulteriori grandezze sono richieste a seconda dello specifico modello fluidodinamico utilizzato.

Per garantire uno studio completo della fluidodinamica all'interno del capillare si ricorre all'utilizzo di modelli di flusso di diverso tipo.

4.4 Mixture Model

Il "Mixture Model" è adatto per modellizzare miscele caratterizzate da particelle solide immerse in un liquido. Questo modello si basa sulla distinzione di due fasi: una fase "dispersa" rappresentata dalle particelle, e una fase "continua" rappresentata dal liquido.

È in grado di analizzare l'andamento sia di flussi laminari che turbolenti. Nel caso di flussi laminari, è in grado di trattare fluidi non-newtoniani: questa potenzialità viene sfruttata per la nostra applicazione.

Il modello introduce alcune ipotesi:

- la densità di ciascuna fase è approssimativamente costante;
- entrambe le fasi risentono dello stesso campo di pressione;
- la velocità relativa tra le due fasi è determinata essenzialmente da un bilancio tra pressione, gravità e forze di trascinamento viscoso (viscous drag);
- le particelle sono rigide e sferiche.

Le variabili dipendenti risolte dal modello sono: il campo di velocità \mathbf{u} nelle tre componenti u , v , w rispettivamente in direzione x , y e z ; la pressione p ; la frazione in volume della fase dispersa ϕ_d .

4.4.1 Equazioni

Di seguito vengono riportate e descritte le equazioni alla base del modello.

L'equazione di conservazione della quantità di moto per la miscela è data da

$$\rho \mathbf{u}_t + \rho(\mathbf{u} \cdot \nabla)\mathbf{u} = -\nabla p - \nabla \cdot \left((\rho c_d(1 - c_d))\mathbf{u}_{slip}\mathbf{u}_{slip} \right) + \nabla \cdot \tau_{Gm} + \rho \mathbf{g} + \mathbf{F} \quad (4.1)$$

dove \mathbf{u} rappresenta la velocità (m/s), \mathbf{u}_t la derivata della velocità rispetto al tempo (m/s^2), ρ la densità (kg/m^3), p la pressione (Pa), c_d la frazione in massa della fase dispersa (kg/kg), \mathbf{u}_{slip} la velocità relativa tra le due fasi (m/s), τ_{Gm} la somma di sforzo viscoso e turbolento ($kg/(m \cdot s^2)$), \mathbf{g} il vettore gravità (m/s^2), \mathbf{F} eventuali forze di volume (N/m^3).

La velocità \mathbf{u} è la velocità della miscela, definita come

$$\mathbf{u} = \frac{\phi_c \rho_c \mathbf{u}_c + \phi_d \rho_d \mathbf{u}_d}{\rho} \quad (4.2)$$

dove Φ_c e Φ_d rappresentano rispettivamente la frazione in volume della fase continua e della fase dispersa (m^3/m^3), \mathbf{u}_c la velocità della fase continua (m/s), \mathbf{u}_d la velocità della fase dispersa (m/s), ρ_c la densità della fase continua (kg/m^3), ρ_d la densità della fase dispersa (kg/m^3), ρ la densità della miscela (kg/m^3).

La velocità relativa tra le due fasi è definita come

$$\mathbf{u}_d - \mathbf{u}_c = \mathbf{u}_{cd} = \mathbf{u}_{slip} - \frac{D_{md}}{(1-c_d)\phi_d} \nabla \phi_d \quad (4.3)$$

dove \mathbf{u}_{slip} rappresenta la velocità relativa tra le due fasi (m/s), D_{md} è un coefficiente di dispersione turbolenta (m^2/s). Questo coefficiente è nullo se viene impostato un flusso laminare.

La densità della miscela è data da

$$\rho = \phi_c \rho_c + \phi_d \rho_d \quad (4.4)$$

dove ρ_c e ρ_d sono le densità rispettivamente della fase continua e della fase dispersa (kg/m^3).

La frazione in massa della fase dispersa c_d è data da

$$c_d = \frac{\phi_d \rho_d}{\rho} \quad (4.5)$$

La somma degli stress turbolenti e viscosi è data da

$$\tau_{Gm} = (\mu + \mu_T) [\nabla \mathbf{u} + \nabla \mathbf{u}^T] \quad (4.6)$$

dove μ è la viscosità della miscela ($Pa \cdot s$), μ_T la viscosità turbolenta ($Pa \cdot s$). Quest'ultima è pari a zero in assenza di turbolenza.

L'equazione del trasporto per Φ_d , frazione in volume della fase dispersa, è

$$\frac{\partial}{\partial t} (\phi_d \rho_d) + \nabla \cdot (\phi_d \rho_d \mathbf{u}_d) = -m_{dc} \quad (4.7)$$

dove m_{dc} rappresenta il trasferimento di massa dalla fase dispersa alla fase continua ($\text{kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$) e \mathbf{u}_d è la velocità della fase dispersa (m/s), in accordo con l'equazione (4.3). Nel nostro caso m_{dc} assume valore nullo.

La frazione in volume della fase continua è data da

$$\phi_c = 1 - \phi_d \quad (4.8)$$

L'equazione di continuità per la miscela è

$$\rho_t + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u}) = 0 \quad (4.9)$$

dove ρ_t è la derivata della densità nel tempo ($\text{kg}/(\text{s} \cdot \text{m}^3)$).

Come detto in precedenza, il modello assume costanti le densità di entrambe le fasi usando l'equazione seguente come alternativa all'equazione di continuità per la miscela:

$$(\rho_c - \rho_d) \left[\nabla \cdot (\phi_d (1 - c_d) \mathbf{u}_{slip} - D_{md} \nabla \phi_d) + \frac{m_{dc}}{\rho_d} \right] + \rho_c (\nabla \cdot \mathbf{u}) = 0 \quad (4.10)$$

ottenuta da (4.7) e (4.9).

Le equazioni viste finora subiscono un'ulteriore semplificazione introducendo l'ipotesi di flusso stazionario, quindi il venir meno della dipendenza dal tempo delle grandezze.

La risoluzione di queste equazioni alle derivate parziali è possibile imponendo opportune condizioni iniziali e al contorno.

4.4.2 Condizioni iniziali

Per garantire e facilitare la convergenza delle simulazioni, sono state imposte condizioni iniziali relative ai parametri velocità, pressione e frazione in volume della fase dispersa.

Tali condizioni sono estese all'intero dominio e sono da intendersi come valori delle grandezze al tempo $t = 0$ s.

Per la velocità si impone un profilo parabolico tridimensionale in direzione x (direzione del flusso) dato da

$$u = -\frac{4}{w_{cap}^2} \cdot -\frac{4}{d_{cap}^2} \cdot \frac{Q}{A_{trasv_cap}} \cdot (z^2 - w_{cap} \cdot z)(y^2 - d_{cap} \cdot y) \quad (4.11)$$

dove w_{cap} è l'altezza del capillare (m), d_{cap} la profondità (m), Q la portata (m^3/s), A_{trasv_cap} l'area della sezione trasversale del capillare (m^2).

Mentre in direzione y e z si impongono valori nulli:

$$\begin{aligned} v &= 0 \\ w &= 0 \end{aligned} \quad (4.12)$$

Per la pressione viene definito un andamento lineare in direzione x dato da

$$p = p_{inlet} \cdot \left(1 - \frac{x}{l_{cap}}\right) \quad (4.13)$$

dove p_{inlet} è la pressione in corrispondenza dell'ingresso (Pa) e l_{cap} la lunghezza del capillare (m).

La frazione in volume della fase dispersa all'istante iniziale è definita come

$$\phi_d = H_t \quad (4.14)$$

dove H_t è l'ematocrito (m^3/m^3).

Con queste condizioni si cerca di riprodurre quanto realmente avviene all'interno del capillare, con valori dello stesso ordine di grandezza e profili prossimi a quelli attesi.

4.4.3 Condizioni al contorno

Le condizioni al contorno vengono definite in parete, in ingresso e in uscita, sia per la miscela, sia per la sola fase dispersa.

In parete si impone una velocità nulla per la miscela (no slip condition) e assenza di flusso attraverso la parete per la fase dispersa, rispettivamente

$$\mathbf{u} = 0 \quad (4.15)$$

$$-\mathbf{n} \cdot (\phi_d \mathbf{u}_d) = 0 \quad (4.16)$$

dove \mathbf{u} è la velocità della miscela (m/s), \mathbf{n} la normale alla superficie della parete, ϕ_d la frazione in volume della fase dispersa (m^3/m^3), \mathbf{u}_d la velocità della fase dispersa (m/s).

In ingresso, per la miscela, viene impostata una velocità $\mathbf{u} = \mathbf{u}_0$ definita nelle tre componenti

$$\begin{aligned} \mathbf{u}_{0x} &= 0 \\ \mathbf{u}_{0y} &= 0 \\ \mathbf{u}_{0z} &= -(Q/A_{inlet_cap}) \end{aligned} \quad (4.17)$$

dove Q è la portata (m^3/s), A_{inlet_cap} l'area della sezione d'ingresso del capillare (m^2).

Mentre per la fase dispersa si definisce il valore della frazione in volume come

$$\phi_d = \phi_{d0} = H_t \quad (4.18)$$

dove H_t è il valore dell'ematocrito (m^3/m^3).

In uscita la miscela sarà caratterizzata da una pressione nulla e assenza di sforzi viscosi

$$p = p_0 = 0 \text{ Pa} \quad (4.19)$$

$$[\mu(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T)]\mathbf{n} = 0 \quad (4.20)$$

dove μ è la viscosità della miscela (Pa·s).

Per la fase dispersa, invece, si sceglie l'opzione "dispersed phase outlet", condizione che definisce la fuoriuscita della particelle attraverso il bordo, con velocità \mathbf{u}_d , senza imporre alcun valore alla frazione in volume.

4.4.4 Gravità

È stata introdotta l'influenza della gravità sull'intero dominio scegliendo i seguenti valori per le tre componenti vettoriali

$$\begin{aligned} g_x &= 0 \\ g_y &= 0 \\ g_z &= -g_{const} \end{aligned} \quad (4.21)$$

dove $g_{const} = 9.8066 \text{ m/s}^2$.

4.4.5 Discretizzazione

Le equazioni caratteristiche del modello vengono discretizzate in modo tale che il tipo di elementi, utilizzati nella formulazione ad elementi finiti, sia del secondo ordine per la velocità e lineare (primo ordine) per il campo di pressione.

Questo tipo di discretizzazione (P2+P1) è consigliato per modelli basati sulle equazioni di Navier-Stokes e per flussi a basse velocità. L'utilizzo di elementi di ordine superiore al primo comporta un incremento del numero di gradi di libertà e, quindi, dell'accuratezza della soluzione.

4.4.6 Slip velocity model

Per definire la velocità relativa tra fase continua e fase discreta (\mathbf{u}_{slip}) si ricorre all'utilizzo del modello di Hadamard-Rybczynski., basato sulla seguente relazione:

$$\frac{3}{4} \frac{C_d}{d_d} \rho_c |\mathbf{u}_{slip}| \mathbf{u}_{slip} = -\frac{(\rho - \rho_d)}{\rho} \nabla p \quad (4.22)$$

dove ρ è la densità della miscela (kg/m^3), ρ_d la densità della fase dispersa (kg/m^3), ρ_c la densità della fase continua (kg/m^3), d_d il diametro delle particelle (m), \mathbf{u}_{slip} la velocità relativa tra le due fasi (m/s), p la pressione (Pa).

Quest'equazione rappresenta un bilancio tra le forze di trascinamento viscoso, di pressione e di gravità agenti sulla fase dispersa. È applicabile per fasi disperse di vario tipo: particelle, gocce liquide, bolle.

C_d è il coefficiente di trascinamento per la fase dispersa:

$$C_d = \frac{24}{Re_p} \left(\frac{1 + \frac{2\mu_c}{3\mu_d}}{1 + \frac{\mu_c}{\mu_d}} \right) \quad (4.23)$$

dove μ_c è la viscosità della fase continua (Pa·s), μ_d la viscosità della fase dispersa (nel caso di particelle assume valore infinito), mentre Re_p è il numero di Reynolds per le particelle definito come

$$Re_p = \frac{d_d \rho_c |\mathbf{u}_{slip}|}{\mu_c} \quad (4.24)$$

dove d_d è il diametro delle particelle (m).

La legge di trascinamento di Hadamard-Rybczynski è valida se il numero di Reynolds per le particelle è minore di 1, il che è sempre vero nelle nostre applicazioni.

Sostituendo l'equazione (4.23) e (4.24) nella (4.22), si ottiene:

$$\mathbf{u}_{slip} = -\frac{(\rho - \rho_d) d_d^2}{18 \rho \mu_c} \nabla p \quad (4.25)$$

4.4.7 Mixture viscosity model

Il valore della viscosità della miscela viene ricavato attraverso l'equazione di Krieger:

$$\mu = \mu_c \left(1 - \frac{\phi_d}{\phi_{max}}\right)^{-2.5\phi_{max}\mu^*} \quad (4.26)$$

dove μ_c è la viscosità della fase continua (Pa·s), ϕ_d è la frazione in volume della fase dispersa (m^3/m^3).

ϕ_{max} è definita come “maximum packing concentration” e vale 0.62 nel caso di particelle sferiche di uguale diametro, mentre μ^* è un parametro adimensionale pari a 1 (nel caso di fase dispersa costituita da bolle o gocce liquide μ^* assume valori diversi e dipendenti dalle viscosità delle due fasi).

Questa equazione deriva dal modello di Krieger-Dougherty [18] ed è l'espressione comunemente usata per determinare la viscosità di una miscela.

Essendo i globuli rossi altamente deformabili e molto propensi a impacchettarsi formando rouleaux (soprattutto per bassi valori di shear rate), è possibile aumentare il valore del parametro ϕ_m fino a 1 [4]. Infatti, nella realtà, i globuli possono addensarsi in modo tale da ridurre al minimo lo spazio tra un eritrocita e quello adiacente, cosa impossibile considerando particelle rigide sferiche.

Aumentando il valore di ϕ_m si hanno variazioni significative del valore di viscosità, rispetto al caso $\phi_m = 0.62$, solo a partire da valori di ematocrito superiori a $0.25 \div 0.30$ (Fig. 4.3).

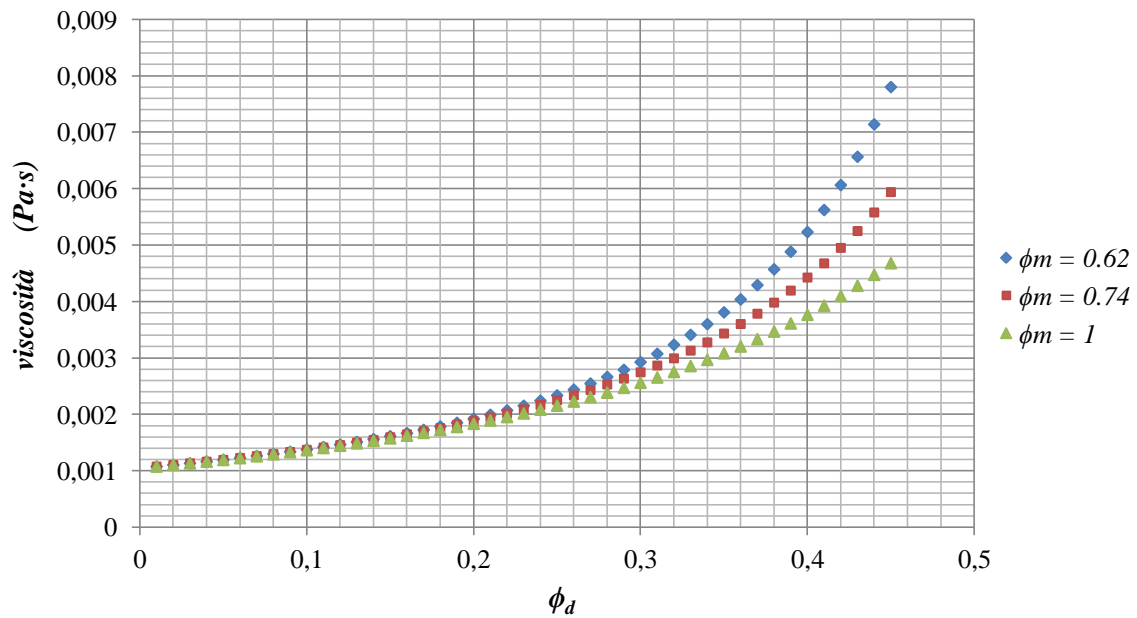


Fig. 4.3 Il grafico mostra l'andamento della viscosità della miscela al variare dell'ematokrito ($\phi_d \equiv Ht$) e di ϕ_m secondo la legge di Krieger (i dati riportati sono limitati ad un valore di ematokrito massimo pari a 0.45)

Dal grafico si comprende come, per ematokriti inferiori a circa 25%, l'influenza del valore di ϕ_m (per un intervallo compreso tra 0.62 e 1) sul valore finale di viscosità è trascurabile.

4.4.8 Fase continua e fase dispersa

La fase continua del mixture model corrisponde sostanzialmente al PBS, le cui caratteristiche sono state definite nei materiali. Si assumono gli stessi valori di viscosità e densità:

$$\mu_c = \mu_{pbs} = 1.05 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$$

$$\rho_c = \rho_{pbs} = 1000 \text{ kg/m}^3$$

La fase dispersa, allo stesso modo, viene associata con le proprietà dei globuli rossi definite in precedenza:

$$\rho_d = \rho_{rbc} = 1090 \text{ kg/m}^3$$

È richiesto, inoltre, il valore del diametro delle particelle le quali, come detto, vengono considerate sferiche con diametro:

$$d_d = 8 \mu m$$

Il modello non permette di elaborare e visualizzare nel dettaglio la traiettoria e il comportamento di ogni singola particella. Fornisce, invece, in ogni punto il valore della frazione in volume della fase dispersa.

4.5 Laminar Flow Model

Il modello “Laminar Flow” consente di riprodurre il comportamento di un fluido, costituito da un’unica fase, in moto laminare in un sistema aperto o chiuso.

Le variabili dipendenti risolte dal modello sono: il campo di velocità \mathbf{u} nelle tre componenti u, v, w rispettivamente in direzione x, y e z; la pressione p.

4.5.1 Equazioni

Alla base di questo modello vi sono le equazioni di Navier-Stokes.

L’equazione di continuità è espressa come

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u}) = 0 \quad (4.27)$$

mentre l’equazione di conservazione della quantità di moto è data da

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = \nabla \cdot [-p\mathbf{I} + \boldsymbol{\tau}] + \mathbf{F} \quad (4.28)$$

dove ρ è la densità del fluido (kg/m^3), \mathbf{u} il vettore velocità (m/s), p la pressione (Pa), $\boldsymbol{\tau}$ il tensore degli sforzi viscosi (Pa), \mathbf{F} il vettore delle forze di volume (N/m^2).

Considerando il fluido newtoniano e assumendo l'ipotesi di Stokes, il tensore degli sforzi viscosi diventa

$$\boldsymbol{\tau} = 2\mu\boldsymbol{S} - \frac{2}{3}\mu(\nabla \cdot \mathbf{u})\mathbf{I} \quad (4.29)$$

dove μ è la viscosità dinamica del fluido (Pa·s) e \boldsymbol{S} è il tensore della velocità di deformazione definito come

$$\boldsymbol{S} = \frac{1}{2}(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T) \quad (4.30)$$

Considerando la proprietà di incomprimibilità del fluido (densità costante o pressoché costante), l'equazione di continuità (4.27) diventa

$$\rho\nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (4.31)$$

mentre l'equazione di conservazione della quantità di moto (4.28) è riscritta come

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho(\mathbf{u} \cdot \nabla)\mathbf{u} = \nabla \cdot [-p\mathbf{I} + \mu(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T)] + \mathbf{F} \quad (4.32)$$

L'ipotesi di flusso stazionario, inoltre, consente di escludere la dipendenza dal tempo delle grandezze: questo si traduce con l'eliminazione del termine $\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}$ nell'equazione precedente.

La possibilità di ottenere soluzioni a partire dalle equazioni alle derivate parziali viste in precedenza, è subordinato alla definizione di opportune condizioni iniziali e al bordo.

4.5.2 Condizioni iniziali

Le condizioni iniziali, in questo caso, non necessariamente richiedono la definizione di profili e valori prossimi a quelli attesi, ma possono essere mantenute nulle. Una maggior

semplicità intrinseca del “laminar model” rispetto al “mixture model” garantisce comunque la convergenza delle simulazioni.

$$\begin{aligned} \mathbf{u} &= 0 \text{ m/s} \\ p &= 0 \text{ Pa} \end{aligned} \tag{4.33}$$

4.5.3 Condizioni al contorno

Le condizioni imposte sul bordo del dominio coinvolgono la parete e la zona d’ingresso e uscita del fluido.

Per il fluido in parete viene introdotta la condizione di non scivolamento (no-slip condition) espressa come

$$\mathbf{u} = 0 \tag{4.34}$$

che identifica l’assenza di movimento del fluido in corrispondenza delle pareti.

In ingresso vi è la possibilità di definire direttamente una portata in massa m data da

$$m = Q \cdot \rho \tag{4.35}$$

dove Q è la portata volumetrica (m^3/s) e ρ la densità (kg/m^3).

Questa scelta viene tradotta matematicamente dal modello con l’integrale di superficie

$$-\int_{\partial\Omega} \rho(\mathbf{u} \cdot \mathbf{n}) = dSm \tag{4.36}$$

dove \mathbf{n} è il versore normale alla superficie e dS l’inverso del differenziale ($1/\text{m}^2$). In questo modo si assume che il flusso di massa sia parallelo alla normale la superficie d’ingresso.

Per l'uscita si sceglie una pressione nulla e assenza di sforzi viscosi:

$$p = p_0 = 0 \quad (4.37)$$

$$[\mu(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T)]\mathbf{n} = 0 \quad (4.38)$$

dove μ è la viscosità (Pa·s).

4.5.4 Discretizzazione

Le equazioni caratteristiche del modello vengono discretizzate in modo tale che il tipo di elementi, utilizzati nella formulazione ad elementi finiti, sia del secondo ordine per la velocità e lineare (primo ordine) per il campo di pressione.

Questo tipo di discretizzazione (P2+P1) è consigliato per modelli basati sulle equazioni di Navier-Stokes e per flussi a basse velocità. L'utilizzo di elementi di ordine superiore al primo comporta un incremento del numero di gradi di libertà e, quindi, dell'accuratezza della soluzione.

4.5.5 Proprietà del fluido

Il laminar flow model viene utilizzato in associazione con un altro modello chiamato "Particle tracing for fluid flow" model (cfr par. 4.6). Questo modello viene sfruttato per tracciare l'andamento e individuare la posizione delle particelle istante per istante. Il modello laminare fornisce, come input al "particle model", tutte le caratteristiche del flusso di solo PBS nel condotto. Sulla base di questo il "particle model" introduce le particelle e ne definisce la traiettoria. Di conseguenza, la densità e la viscosità del fluido di lavoro per il "laminar flow model" coincidono con quelle definite nei materiali per il PBS:

$$\rho = \rho_{pbs} = 1000 \text{ kg/m}^3$$

$$\mu = \mu_{pbs} = 1.05 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$$

4.6 Particle Tracing for Fluid Flow Model

Il “Particle tracing for fluid flow model” consente di rilevare la traiettoria di particelle immerse in un fluido in movimento. Il percorso degli elementi in sospensione è influenzato dalle caratteristiche del fluido di base, dal tipo di flusso che si instaura, dalla presenza di forze di trascinamento e forze esterne come la gravità.

Le informazioni relative alla reologia del fluido sono fornite dal “laminar model” come input al “particle model” il quale, a sua volta, aggiunge tutti i dati riguardanti le caratteristiche delle particelle e del loro rilascio. Accoppiando questi due modelli si ha la possibilità di riprodurre il comportamento di un fluido bifase con in più, rispetto al “mixture model”, la capacità di individuare la posizione delle particelle in ogni istante.

Le variabili dipendenti risolte dal modello sono le componenti del vettore posizione \mathbf{q} : q_x , q_y , q_z .

4.6.1 Equazioni

Il movimento delle particelle è descritto dalla quantità di moto tramite la seconda legge di Newton:

$$\frac{d}{dt}(m_p \mathbf{v}_p) = \mathbf{F}_D + \mathbf{F}_g + \mathbf{F}_{ext} \quad (4.39)$$

dove m_p è la massa della particella (kg), \mathbf{v}_p è la velocità della particella (m/s), \mathbf{F}_D la drag force (N), \mathbf{F}_g la forza di gravità (N), \mathbf{F}_{ext} eventuali forze esterne che influenzano il moto delle particelle (N).

In un sistema inerziale, la risultante delle forze agenti su ciascuna particella eguaglia la variazione nel tempo della quantità di moto della particella stessa.

Per questo modello, a differenza dei precedenti due, la tempo dipendenza è fondamentale per riuscire a valutare la posizione della particelle istante per istante.

La forza di trascinamento (drag force) è la forza che il fluido esercita su ciascuna particella a causa della differenza di velocità esistente tra le due fasi:

$$\mathbf{F}_D = m_p F_d (\mathbf{v} - \mathbf{v}_p) \quad (4.40)$$

dove m_p è la massa della particella (kg), F_d è la forza di trascinamento per unità di massa agente sulla particella (1/s), \mathbf{v}_p la velocità della particella (m/s) e \mathbf{v} la velocità del fluido (m/s).

La forza di trascinamento per unità di massa, nel caso di particelle sferiche in un flusso laminare, è definita come

$$F_d = \frac{18\mu}{\rho_d d_p^2} \quad (4.41)$$

dove μ è la viscosità del fluido (Pa·s), ρ_p è la densità delle particelle (kg/m³) e d_p è il diametro della particella (m).

Il campo di velocità del fluido (\mathbf{v}) è il risultato dell'elaborazione effettuata dal “laminar flow model”, mentre la viscosità del fluido (μ) coincide con quella del PBS.

La forza di gravità è data da

$$\mathbf{F}_g = m_p \mathbf{g} \frac{(\rho_p - \rho)}{\rho_p} \quad (4.42)$$

dove ρ è la densità del fluido (kg/m³) e \mathbf{g} il vettore gravità (m/s²).

La densità del fluido coincide con la densità del PBS, mentre il vettore gravità è definito nelle sue componenti come

$$\begin{aligned} g_x &= g_y = 0 \\ g_z &= -g_{const} \end{aligned} \quad (4.43)$$

dove $g_{const} = 9.8066 \text{ m/s}^2$.

Non sono state introdotte ulteriori forze esterne agenti sulle particelle.

4.6.2 Condizioni al contorno

Alla parete viene imposta la condizione di “rimbalzo” ovvero la quantità di moto delle particelle che entrano in contatto con la parete si conserva:

$$\begin{aligned} \mathbf{q}' &= \mathbf{q} \\ \mathbf{v}' &= \mathbf{v} - 2(\mathbf{n} \cdot \mathbf{v})\mathbf{n} \end{aligned} \quad (4.44)$$

dove \mathbf{q} è la quantità di moto della particella prima del contatto (kg·m/s), \mathbf{q}' la quantità di moto dopo il contatto (kg·m/s), \mathbf{v} la velocità della particella prima del contatto (m/s), \mathbf{v}' la velocità dopo il contatto (m/s), \mathbf{n} il vettore normale alla parete.

La particella viene riflessa dalla parete nella direzione del piano tangente. Rispetto alla normale la superficie, l'angolo incidente e l'angolo riflesso coincidono.

In ingresso valgono le seguenti condizioni

$$\begin{aligned} \mathbf{q} &= \mathbf{q}_0 \\ \mathbf{v} &= \mathbf{v}_0 \end{aligned} \quad (4.45)$$

dove \mathbf{q}_0 è la quantità di moto in ingresso (kg·m/s) e \mathbf{v}_0 la velocità del fluido in ingresso ottenuta dall'elaborazione effettuata con il “laminar flow model”.

È possibile definire il numero e la posizione iniziale delle particelle in corrispondenza dell'ingresso, scegliendo tra una distribuzione uniforme o semicasuale. Vi è anche l'opportunità di stabilire i tempi di rilascio e l'intervallo di tempo tra un rilascio e l'altro. In questo modo è possibile, seppur con qualche difficoltà, garantire nel capillare il valore di ematocrito desiderato.

Per quanto riguarda l'uscita si impone la condizione “disappear” che prevede la scomparsa delle particelle in uscita dal dominio. Tale condizione è tradotta dal modello con l'espressione

$$\mathbf{q}' = NaN \quad (4.46)$$

4.6.3 Proprietà delle particelle

Le particelle devono rispecchiare, per quanto possibile, le proprietà dei globuli rossi. Per questo si forniscono al modello i valori di densità ρ_p e diametro d_p pari a

$$\rho_p = \rho_{rbc} = 1090 \frac{kg}{m^3}$$

$$d_p = d_{rbc} = 8 \mu m$$

Anche in questo caso le particelle sono modellizzate come sfere.

4.7 Mesh

La discretizzazione del dominio fluido viene effettuata tramite elementi di tipo tetraedrico che meglio si adattano ad una geometria caratterizzata da tratti rettilinei e curvilinei. La possibilità di modificare le dimensioni, la distribuzione e il numero degli elementi consente di scegliere il tipo di griglia di calcolo più adatto all'applicazione in esame.

Le grandezze su cui si può agire sono:

- “Maximum element size”: dimensione massima dell'elemento;
- “Minimum element size”: dimensione minima dell'elemento;
- “Maximum element growth rate”: massimo tasso di crescita dell'elemento. Questa grandezza determina la modalità con cui avviene il passaggio progressivo da una regione con mesh fitte ad una regione con mesh più larghe;
- “Resolution of curvatures”: risoluzione degli elementi in corrispondenza di tratti curvilinei. Questo parametro definisce la dimensione degli elementi al bordo facendo un confronto con la curvatura del dominio in quel tratto: il raggio di curvatura moltiplicato per la risoluzione dà la dimensione massima ammissibile dell'elemento lungo il bordo;
- “Resolution of narrow regions”: risoluzione degli elementi in corrispondenza di regioni ristrette del dominio. Consente di controllare il numero di layer di elementi presenti in queste zone.

Per valutare quale fosse la mesh migliore, ovvero in grado di fornire risultati con un certo livello di accuratezza, è stata eseguita un'analisi di sensitività. Le combinazioni di valori presi in considerazione sono riportate in tabella 4.3.

	<i>Maximum element size (μm)</i>	<i>Minimum element size (μm)</i>	<i>Maximum element growth rate</i>	<i>Resolution of curvature</i>	<i>Resolution of narrow regions</i>	<i>Number of elements</i>
<i>Mesh A</i>	12.4	3.1	1.3	0.9	0.4	1142793
<i>Mesh B</i>	11.5	3.1	1.3	0.9	0.4	1422695
<i>Mesh C</i>	10.5	3	1.3	0.9	0.4	1948836
<i>Mesh D</i>	9.5	3	1.3	0.9	0.4	2631058
<i>Mesh E</i>	8.06	2.48	1.25	0.8	0.5	4471909
<i>Mesh F</i>	7	2	1.25	0.8	0.5	6890902
<i>Mesh G</i>	6.2	1.86	1.25	0.8	0.5	10039946
<i>Mesh H</i>	5	1.5	1.25	0.8	0.5	18548552

Tab. 4.3 Grandezze caratteristiche e numero di elementi delle mesh

4.8 Tempo di diffusione

Per valutare il tempo di diffusione di una generica molecola in un mezzo, è possibile utilizzare in prima approssimazione l'equazione

$$t_{diff} = x^2 / q_i D \quad (4.47)$$

dove x è la distanza media percorsa dalla molecola in un tempo t (m), q_i è una costante numerica il cui valore dipende dalle dimensioni spaziali (è pari a 6 nel caso di diffusione tridimensionale), D è il coefficiente di diffusione (m^2/s) pari a

$$D = kT / f \quad (4.48)$$

Dove k è la costante di Boltzman pari a $1.38 \cdot 10^{-23}$ (J/K), T è la temperatura (K), f è definito "frictional coefficient" ($\text{Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}$) e vale

$$f = 6\pi \cdot \eta \cdot r \quad (4.49)$$

dove η è la viscosità del mezzo fluido (Pa·s), r è il raggio della particella sferica che diffonde nel mezzo (m).

4.9 Distanza di diffusione

Per stimare l'entità dello spazio percorso dalla molecola diffondente è possibile utilizzare un modello che, ipotizzando una distribuzione omogenea dei globuli rossi nel fluido, associa a ciascun eritrocita una frazione del volume del capillare:

$$V_{rapp} = V_{cap}/n_{rbc} \quad (4.50)$$

dove V_{rapp} è il volume rappresentativo per ciascun globulo dato dal rapporto tra il volume totale del capillare (V_{cap}) e il numero di globuli rossi presenti (n_{rbc}).

Il volume totale del capillare (m^3) è definito come

$$V_{cap} = (l \cdot w \cdot d) + (\pi r^2 \cdot w) \quad (4.51)$$

dove l è la lunghezza del capillare (m), w l'altezza (m), d la profondità (m) e il fattore ($\pi r^2 w$) tiene conto dei due semicilindri in ingresso e uscita esclusi dal primo prodotto (m^3). Considerando le dimensioni riportate in tab. 4.1, V_{cap} risulta pari a $1.4635 \cdot 10^{-10} m^3$.

Il numero di globuli rossi presenti nel capillare è pari a

$$n_{rbc} = (H_T \cdot V_{tot})/V_{rbc} \quad (4.52)$$

dove H_T è l'ematocrito, V_{tot} è il volume complessivo del fluido che coincide con V_{cap} se ogni punto del capillare è occupato dal fluido stesso (m^3), V_{rbc} è il volume del singolo globulo rosso pari a circa $94 \mu m^3$.

Nel caso in cui $V_{tot} \equiv V_{cap}$ (sempre vero nelle nostre analisi)

$$V_{rappr} = V_{cap}/n_{rbc} = V_{tot}/n_{rbc} = V_{rbc}/H_T \quad (4.53)$$

da cui si comprende come una variazione del volume del capillare non altera il valore del volume rappresentativo. V_{rbc} è costante, mentre H_t può variare: all'aumentare dell'ematocrito aumenta il numero di globuli rossi, quindi diminuisce il volume rappresentativo.

Il fluido è da considerarsi suddiviso in tanti cubi adiacenti contenenti ciascuno un solo globulo rosso posto al centro del cubo stesso.

La distanza media di diffusione per una molecola viene considerata pari a metà del lato del volume rappresentativo stesso:

$$d_{diff} = \sqrt[3]{V_{rappr}}/2 = L_{rappr}/2 \quad (4.54)$$

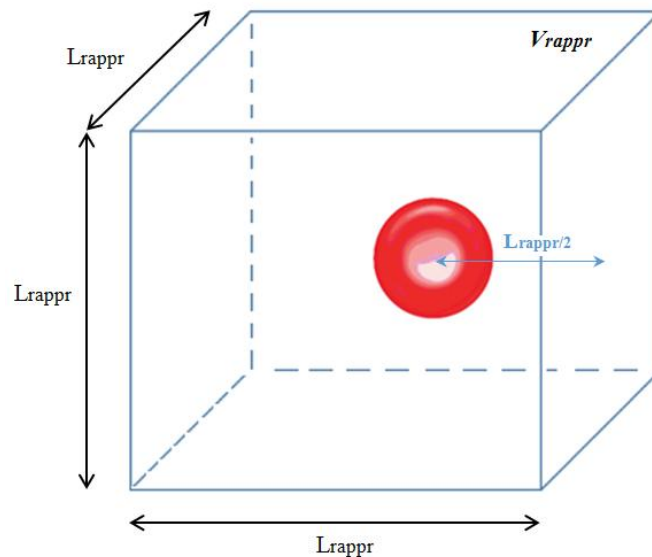


Fig. 4.4 Volume rappresentativo

Come detto all'inizio, questo modello si basa sull'ipotesi secondo cui gli eritrociti si dispongono omogeneamente all'interno del capillare. È noto che, nella realtà, i globuli rossi tendono a spostarsi verso il centro del condotto essendo caratterizzati alle estremità

da un campo di velocità diverso. In questo modo si riduce la distanza tra una cellula e quella vicina, perciò diminuisce anche la distanza che la molecola deve percorrere per entrare nei globuli e di conseguenza anche il tempo di diffusione. Si può dire quindi che il modello utilizzato prende in considerazione il caso peggiore.

4.10 Applicazione dei modelli fluidodinamici

I modelli descritti in precedenza (Mixture Model, Laminar Flow Model, Particle Tracing for Fluid Flow Model) vengono utilizzati per studiare la fluidodinamica all'interno del capillare. In particolare si focalizza l'attenzione sull'analisi del profilo di velocità e della distribuzione degli sforzi di taglio nella sezione trasversale del condotto. I valori di queste grandezze saranno confrontati con i risultati sperimentali provenienti da uno studio recente in cui, utilizzando lo stesso tipo di capillare e una micro-PIV, veniva ricavato l'andamento del profilo di velocità e degli sforzi di taglio di una sospensione di globuli rossi in soluzione fisiologica (cfr par. 3.4). Questo confronto permette, in presenza di eventuali differenze nei risultati, di individuarne le cause e far emergere gli errori commessi e i limiti dei due approcci.

I modelli di flusso vengono utilizzati anche per trovare le condizioni ottimali, in termini di portata, ematocrito e geometria del capillare, tali da garantire l'incapsulamento delle molecole nei globuli. Per fare questo si cerca la giusta combinazione di valori τ - t (shear stress – tempo di sollecitazione) che consenta di individuare un punto di lavoro nei pressi della retta di Tillman.

Infine, i modelli consentono di ricavare un indice che permette di individuare le zone all'interno del capillare a maggior efficacia d'incapsulamento. Se la traiettoria del globulo, durante il moto nel condotto, permane all'interno di queste zone allora è pensabile che avvenga con certezza l'incapsulamento delle molecole probanti.

In particolare, il Mixture Model viene utilizzato per ricavare le principali grandezze d'interesse come il profilo di velocità, la frazione in volume della fase dispersa, lo shear stress. Il Laminar Flow Model con il Particle Tracing for Fluid Flow Model viene utilizzato per individuare la traiettoria delle particelle che simulano il moto dei globuli rossi.

5. RISULTATI

5.1 Analisi di sensitività della mesh

La grandezza di riferimento per valutare la bontà della mesh è la velocità del fluido. Per essere certi di rispettare la condizione di flusso sviluppato, il profilo di velocità viene rilevato a metà capillare ($x = 58.5/2$ mm), lungo la direzione z . Si fa riferimento ad una portata $Q = 0.25 \mu\text{l}/\text{min}$ ed ematocrito $H_T = 1\%$.

Le grandezze caratteristiche delle mesh utilizzate sono riportate in tabella 4.3.

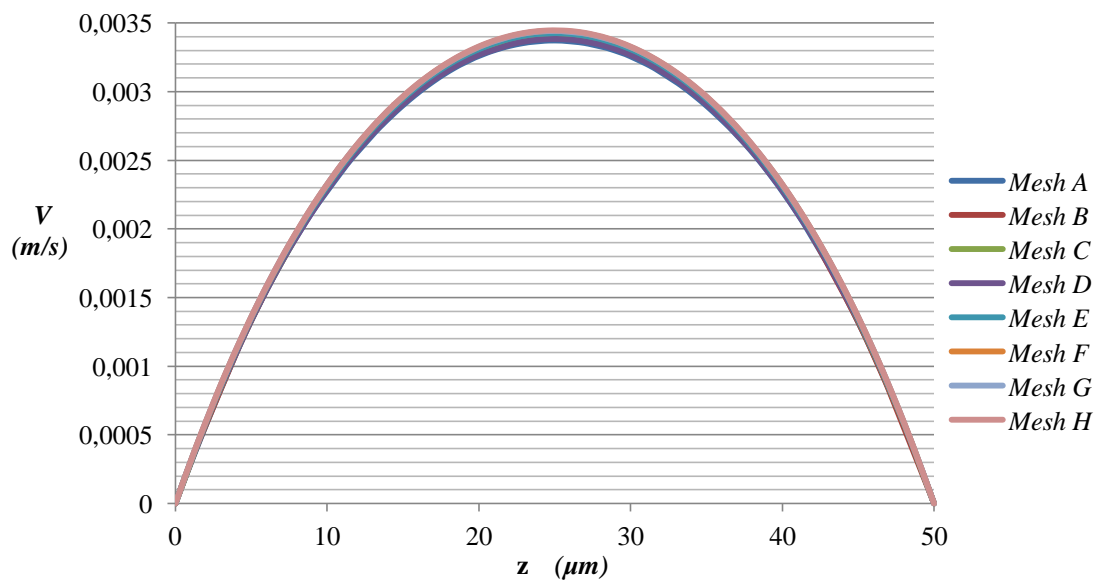


Fig. 5.1 Profili di velocità lungo z al variare della mesh

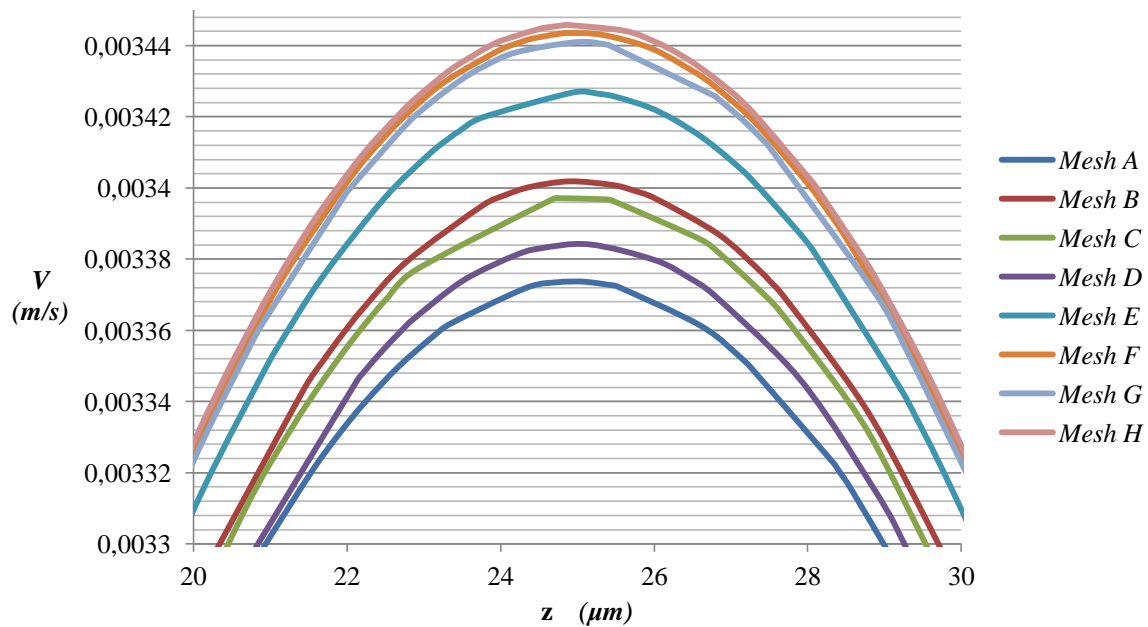


Fig.5.2 Profili di velocità lungo z, particolare

L'aumento del numero di elementi comporta un progressivo avvicinamento al valore reale della grandezza, ma nello stesso momento richiede tempi di calcolo sempre maggiori.

Per garantire una buona accuratezza dei risultati vengono escluse le mesh dalla A alla E mentre, ritenendo equivalenti le mesh che vanno dalla F alla H, si sceglie di ridurre il più possibile la durata delle simulazioni optando per quella con il numero di elementi minore (F).

Dal grafico (Fig. 5.2) si nota come, per la mesh scelta, il profilo di velocità sia ben delineato e rispecchi effettivamente un andamento parabolico.

L'errore commesso viene calcolato rispetto alla mesh con il numero di elementi maggiore e facendo riferimento ai valori massimi di velocità:

$$\varepsilon = \frac{v_{max}^{mesh H} - v_{max}^{mesh x}}{v_{max}^{mesh H}} \cdot 100 \quad x = A \div H \quad (5.1)$$

Di seguito vengono riportati i risultati

	V_{MAX} (m/s)	\mathcal{E}
Mesh A	0.003374	2.1 %
Mesh B	0.003402	1.28 %
Mesh C	0.003397	1.42 %
Mesh D	0.003384	1.8 %
Mesh E	0.003427	0.55 %
Mesh F	0.003444	0.06 %
Mesh G	0.003441	0.15 %
Mesh H	0.003446	/

Tab. 5.1 Valori massimi di velocità ed errore per ciascuna mesh

L'errore relativo alla mesh F è pari allo 0.06 % e viene ritenuto ampiamente accettabile. Tale valore risulta essere minore rispetto a quello relativo alla mesh G nonostante quest'ultima sia caratterizzata da un numero maggiore di elementi.

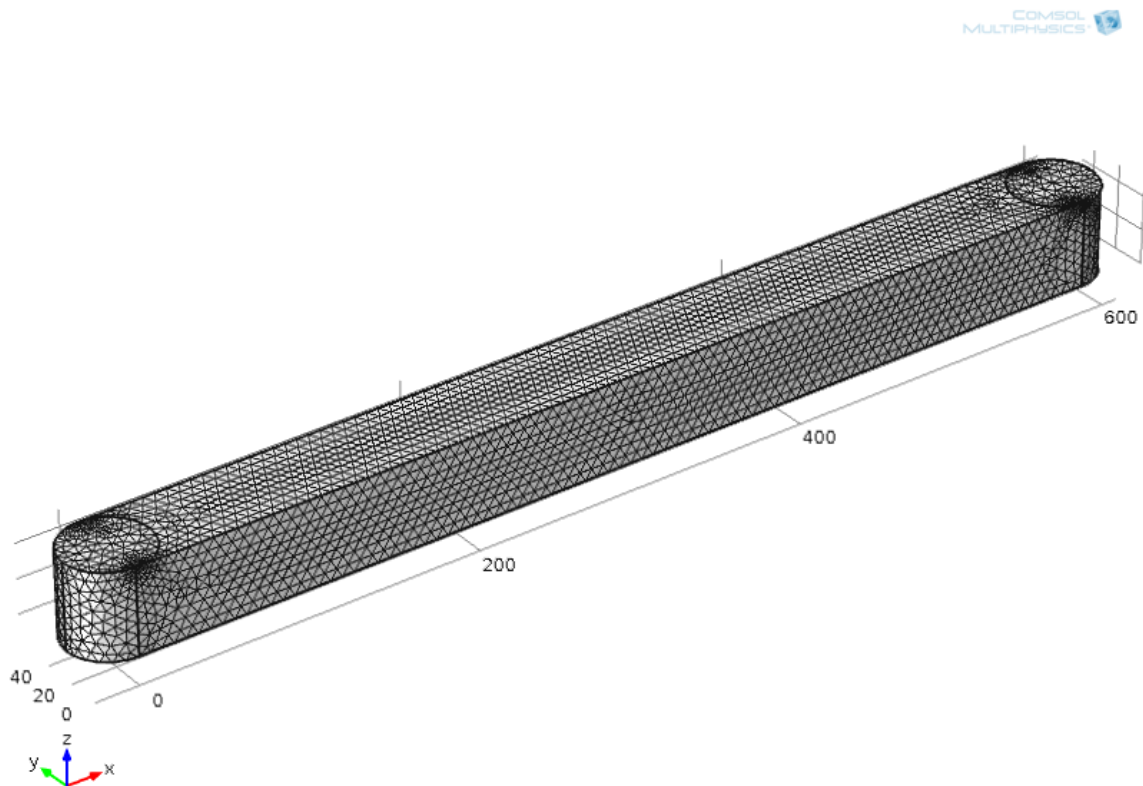


Fig. 5.3 Mesh F (per rendere comprensibile la distribuzione della mesh sull'intera geometria l'immagine fa riferimento ad una lunghezza del capillare ridotta di 100 volte rispetto al valore reale)

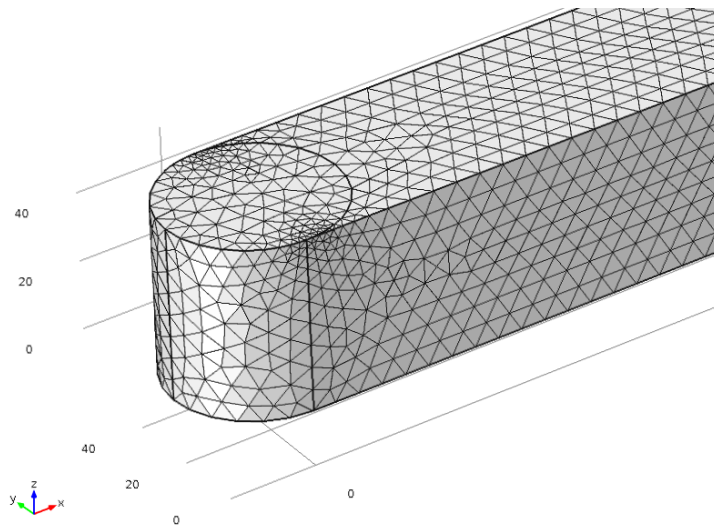


Fig. 5.4 Mesh F in corrispondenza dell'ingresso

5.2 Analisi preliminare e confronto con letteratura

Il primo obiettivo delle simulazioni numeriche è stato quello di studiare il comportamento del fluido all'interno del capillare in termini di velocità e sforzi di taglio. I valori di tali grandezze sono stati confrontati con quelli ottenuti in uno studio recente in cui venivano eseguite prove sperimentali sullo stesso tipo di capillare (cfr par. 3.4).

5.2.1 Velocità

Il flusso è caratterizzato da un profilo di velocità parabolico e simmetrico rispetto all'asse del condotto (Fig. 5.5). Assume valore massimo in centro e nullo alle pareti. Tale andamento si mantiene stazionario e invariato per tutta la lunghezza del capillare (Fig. 5.6).

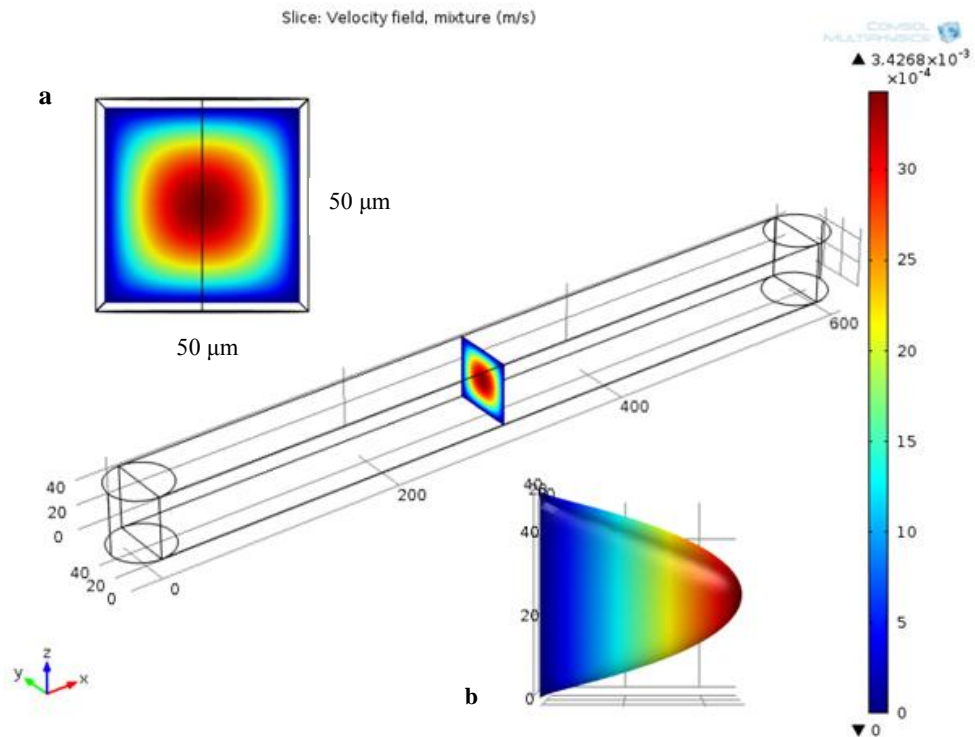


Fig. 5.5 Profilo e valori di velocità per una portata $Q = 0.25 \mu\text{l}/\text{min}$ ed ematocrito $H_T = 0.01$: a. piano y-z; b. piano z-x (per rendere comprensibile la geometria del condotto la lunghezza è stata ridotta di 100 volte rispetto al valore reale)

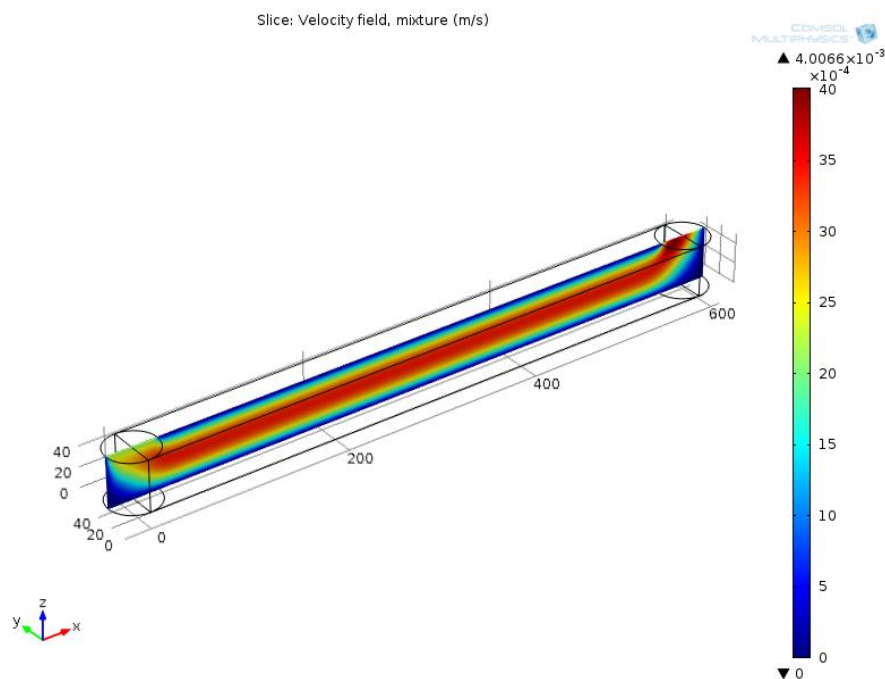


Fig.5.6 Profilo e valori di velocità sul piano z-x per una portata $Q = 0.25 \mu\text{l}/\text{min}$ e ematocrito $H_T = 0.01$ (per rendere comprensibile la geometria del condotto la lunghezza è stata ridotta di 100 volte rispetto al valore reale)

Il profilo di velocità raggiunge una condizione di regime a circa 50 μm dall'ingresso, allo stesso modo in uscita il profilo perde le sue caratteristiche a partire da 50 μm prima della stessa (Fig. 5.7).

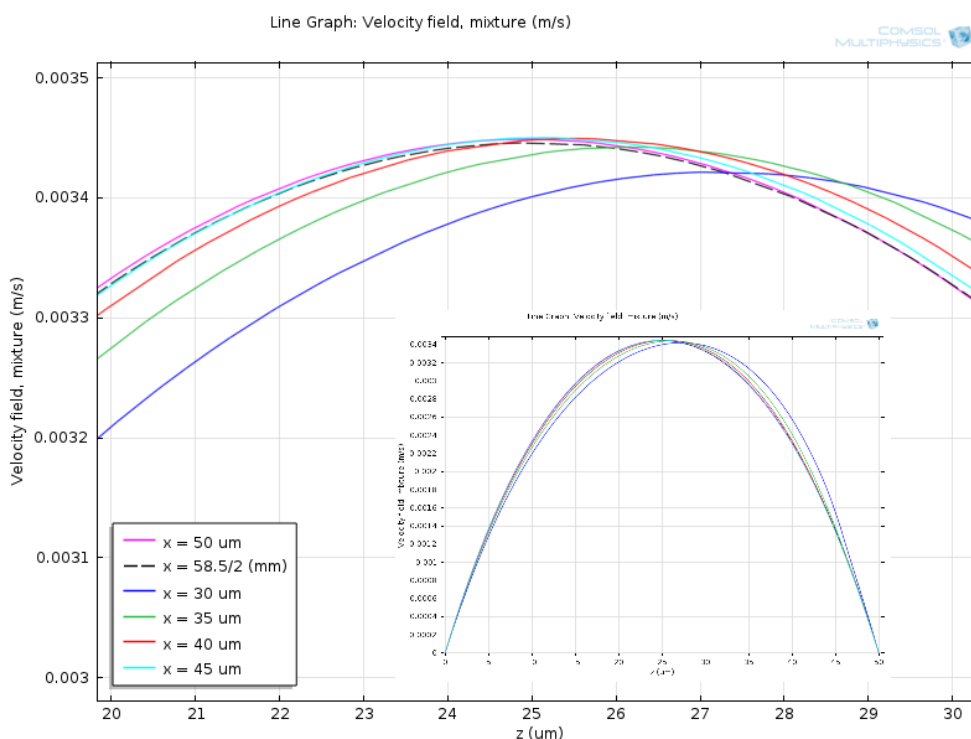


Fig. 5.7 Profili di velocità lungo z man mano che ci si allontana dall'ingresso ($y = 25\mu\text{m}$, $Q = 0.25\mu\text{l}/\text{min}$, $Ht = 0.01$). Il profilo di velocità in $x = 58.5/2$ mm rappresenta la parabola di riferimento

Definito il comportamento del fluido dal punto di vista della velocità, è possibile effettuare un confronto con i valori ottenuti sperimentalmente nel precedente lavoro di tesi (cfr par. 3.4). In quel caso la dimensione del capillare, in termini di altezza e profondità, non rispecchiava esattamente quanto riportato sui cataloghi commerciali. La dimensione attesa era $50 \times 50 \mu\text{m}$ ma, probabilmente a causa delle tolleranze di lavorazione, la dimensione effettiva risultava pari a $46.79 \times 64.73 \mu\text{m}$. Per questo motivo le simulazioni sono state effettuate considerando entrambe queste dimensioni.

Le prove sperimentali erano state condotte assumendo due diversi valori di portata ed ematocrito (Tab. 5.2).

Q ($\mu\text{l}/\text{min}$)	H_T	V_{max_exp} (mm/s)	V_{max_cfd} (mm/s)	$V_{max_cfd\ 50x50}$ (mm/s)
0.25	0.01	2.665	2.7741	3.4268
0.50	0.01	5.082	5.5475	6.8523
0.25	0.05	2.590	2.7731	3.4239
0.50	0.05	5.103	5.5432	6.8445

Tab. 5.2 Valori di velocità massima ottenuti nelle prove sperimentali (V_{max_exp}); a livello computazionale (V_{max_cfd}) con le dimensioni vere e a livello computazionale con le dimensioni teoriche ($V_{max_cfd_50x50}$)

Si nota come, a parità di portata ed ematocrito, la velocità proveniente dalle prove sperimentali sia più bassa rispetto a quella ottenuta nelle simulazioni numeriche ($V_{max_exp} < V_{max_cfd}$). Considerando le dimensioni teoriche ($50 \times 50 \mu\text{m}$) la velocità massima aumenta perché, a parità di Q , è diminuita l'area della sezione trasversale.

5.2.2 Shear stress

Gli sforzi di taglio, calcolati secondo il modello di Casson, seguono un andamento lineare con valore nullo nel centro del capillare e massimo in parete (Fig. 5.8).

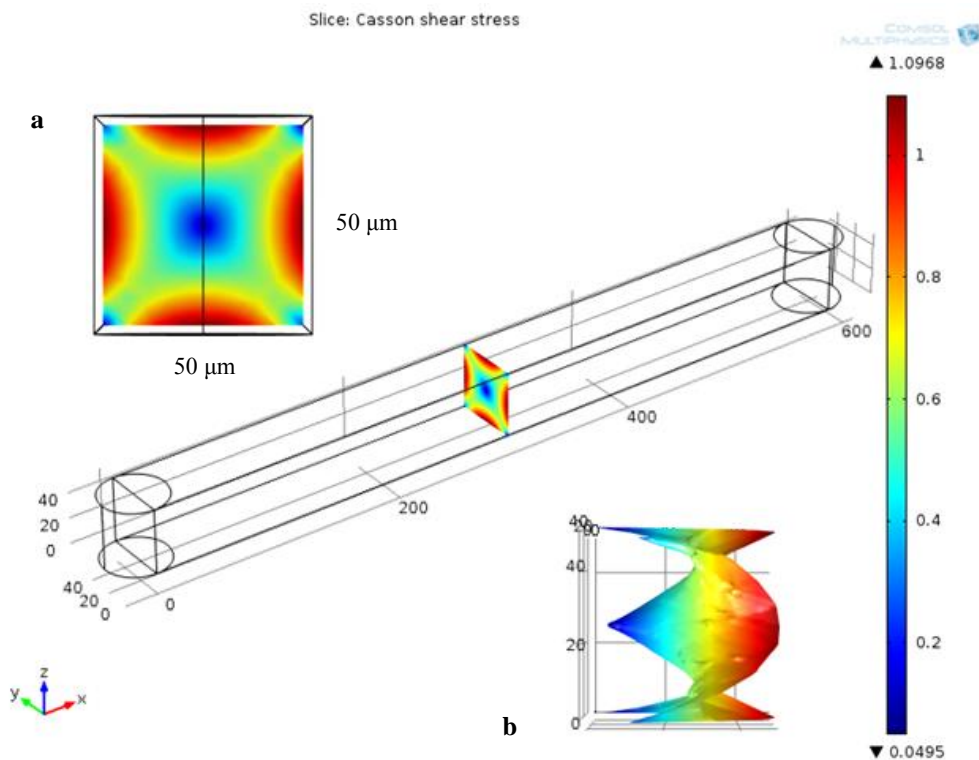


Fig. 5.8 Profilo e valori degli sforzi di taglio (in Pascal) per una portata $Q = 0.25 \mu\text{l}/\text{min}$ ed ematocrito $H_T = 0.05$: a. piano y-z; b. piano z-x (per rendere comprensibile la geometria del condotto la lunghezza è stata ridotta di 100 volte rispetto al valore reale)

In prossimità degli spigoli lo shear stress subisce un drastico decremento dovuto alla particolarità della geometria quadrata della sezione trasversale. In queste regioni, infatti, il profilo di velocità perde il suo carattere parabolico esprimendo un flesso (Fig. 5.9). Questo comporta una riduzione progressiva dello shear rate (il cui valore coincide con il coefficiente angolare della curva in ogni punto) man mano che ci si avvicina allo spigolo, traducendosi quindi in una riduzione dello sforzo di taglio.

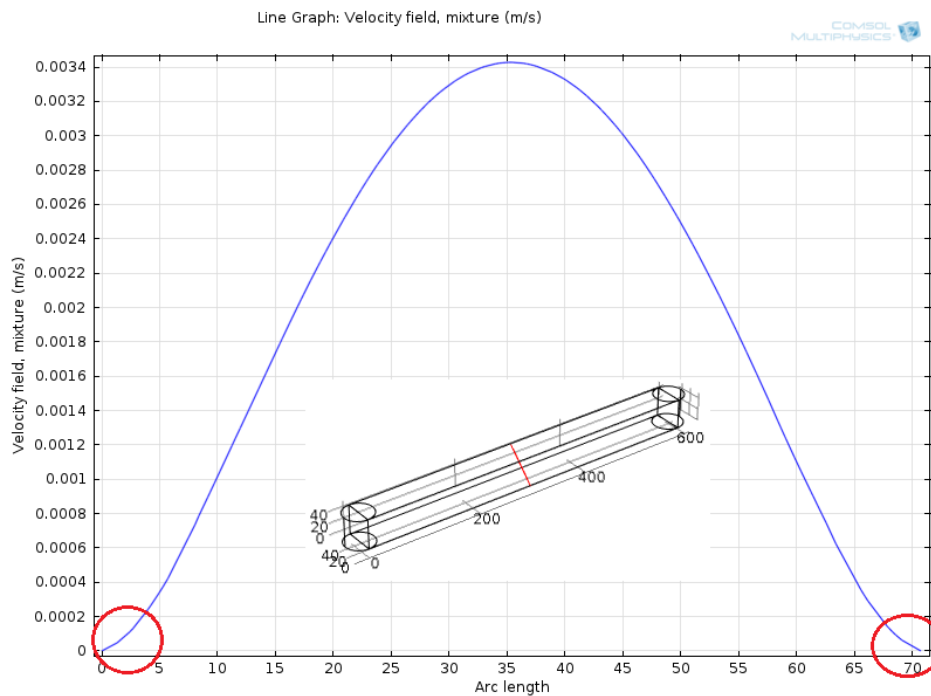


Fig. 5.9 Profilo di velocità lungo la diagonale della sezione quadrata del condotto, in evidenza i tratti di curva che presentano flesso

Anche in questo caso, come per la velocità, è possibile effettuare un confronto tra i dati ottenuti dalle simulazioni e i dati sperimentali. Affinché la comparazione sia efficace, si considera la geometria con le dimensioni reali di altezza e profondità (46.79 x 64.73 μm).

Q ($\mu\text{l}/\text{min}$)	H_T	τ_{max_exp} (mPa)	τ_{max_cfd} (mPa)	$\tau_{max_cfd_50x50}$ (mPa)
0.25	0.01	646.62	500.70	610.3
0.50	0.01	1062.79	1001.40	1220.7
0.25	0.05	616.69	940.03	1096.8
0.50	0.05	1120.12	1635.85	1929.1

Tab. 5.3 Sforzi di taglio massimi ottenuti nelle prove sperimentali (τ_{max_exp}); a livello computazionale (V_{max_cfd}) con le dimensioni vere e a livello computazionale con le dimensioni teoriche ($V_{max_cfd_50x50}$)

Osservando i valori riportati in tabella si nota una differenza evidente tra gli sforzi di taglio ottenuti sperimentalmente e quelli ottenuti a livello computazionale. Riducendo l'area della sezione trasversale, a parità di portata ed ematocrito, l'entità delle sollecitazioni tangenziali aumenta ($\tau_{\max_cfd_50 \times 50} > \tau_{\max_cfd}$).

5.3 Prove di ottimizzazione

Il secondo obiettivo di questo lavoro è quello di trovare le migliori condizioni in termini di portata, ematocrito, perdite di carico e dimensioni del capillare, che favoriscano l'incapsulamento.

La facilità con cui gli eritrociti sono in grado di inglobare molecole dipende dall'intensità e dalla durata della sollecitazione meccanica agente sulla membrana.

Prove sperimentali hanno dimostrato che la posizione ottimale sul diagramma di Tillman è quella che vede gli sforzi di taglio massimi situati appena al di sopra della retta [3]. Questo consentirebbe da un lato di ottenere un buon incapsulamento e dall'altro di evitare l'emolisi cellulare.

Considerando i dati provenienti dalle prove sperimentali (Tab. 5.4), è possibile identificare la loro posizione rispetto alla curva di Tillman (Fig. 5.10).

Q ($\mu\text{l}/\text{min}$)	H_T	τ_{\max_exp} (Pa)	t_{medio} (s)
0.25	0.01	0.64662	46.05
0.50	0.01	1.06279	24.15
0.25	0.05	0.61669	47.38
0.50	0.05	1.12012	24.05

Tab. 5.4 Valori di shear stress e tempo medio di passaggio nel capillare ($t_{medio} = L / V_{media}$)

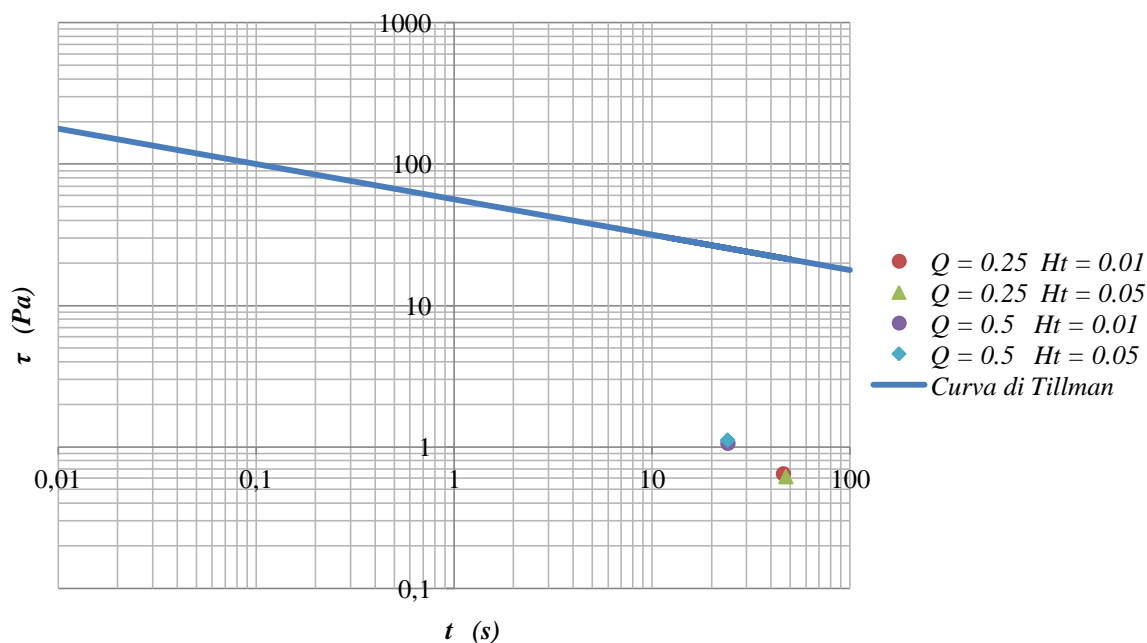


Fig. 5.10 Diagramma di Tillman e coppie di valori $\tau_{\max_exp_2} - t$

Si nota come le coppie di valori τ - t siano situate molto al di sotto della retta. Questo significa che si è lontani dalla condizione ottimale d'incapsulamento.

Volendo riportare sul grafico anche i valori relativi a $\tau_{\max_exp_1}$, τ_{\max_cfd} , $\tau_{\max_cfd_50x50}$, la loro posizione sarebbe poco distante rispetto a quella dei punti precedenti.

Per potersi avvicinare il più possibile alla retta di Tillman è necessario aumentare gli sforzi di taglio agenti sui globuli. Aumentando ad esempio la portata, a parità di area della sezione trasversale (le dimensioni di riferimento d'ora in avanti saranno $50 \times 50 \mu\text{m}$), aumentano i valori di velocità, lo shear rate e quindi anche gli sforzi di taglio.

Tutto questo è subordinato alla possibilità di garantire un tempo di sollecitazione pari o superiore al tempo necessario affinché le molecole diffondano all'interno degli eritrociti.

Il tempo di diffusione è strettamente legato alla distanza percorsa dalla molecola che, a sua volta, secondo l'equazione 4.54, dipende dall'ematocrito (H_T), dal volume totale di fluido nel capillare (V_{tot}) e dal volume del singolo globulo rosso (V_{rbc}).

Di seguito vengono riportati i valori della distanza di diffusione (d_{diff}) in funzione dell'ematocrito.

H_T	n_{rbc}	$V_{rappr} (m^3)$	$d_{diff} (m)$
0.01	$1.56 \cdot 10^4$	$9.40 \cdot 10^{-15}$	$1.06 \cdot 10^{-5}$
0.05	$7.78 \cdot 10^4$	$1.88 \cdot 10^{-15}$	$6.17 \cdot 10^{-6}$
0.10	$1.56 \cdot 10^5$	$9.40 \cdot 10^{-16}$	$4.90 \cdot 10^{-6}$
0.15	$2.34 \cdot 10^5$	$6.27 \cdot 10^{-16}$	$4.28 \cdot 10^{-6}$
0.20	$3.11 \cdot 10^5$	$4.70 \cdot 10^{-16}$	$3.89 \cdot 10^{-6}$
0.25	$3.89 \cdot 10^5$	$3.76 \cdot 10^{-16}$	$3.61 \cdot 10^{-6}$
0.30	$4.67 \cdot 10^5$	$3.13 \cdot 10^{-16}$	$3.40 \cdot 10^{-6}$

Tab. 5.5 Valori di ematocrito (H_T), numero di RBC (n_{rbc}), volume rappresentativo (V_{rappr}) e distanza di diffusione (d_{diff})

Nota la distanza di diffusione, è possibile stimare il tempo impiegato dalla molecola per entrare nella cellula. Per fare questo è necessario definire alcune grandezze: il valore di viscosità del fluido (η) viene fatto coincidere con quello del PBS, la temperatura viene posta a 20°C e il raggio della molecola viene assunto pari al raggio di Stokes del FITC-Destrano con peso molecolare 40000 Da (Tab. 5.6). Questo tipo di molecola è stata spesso usata in passato per eseguire prove sperimentali d'incapsulamento [2-5].

$\eta (Pa \cdot s)$	$r (m)$	$T (K)$
$1.05 \cdot 10^{-3}$	$4.5 \cdot 10^{-9}$	293.15

Tab. 5.6 Valori della viscosità del fluido (η), raggio di Stokes della molecola (r) e temperatura (T)

A partire da questi valori e risolvendo le equazioni 4.47, 4.48 e 4.49, si ricava il tempo di diffusione (Tab. 5.7).

H_T	$d_{diff} (m)$	$t_{diff} (s)$
0.01	$1.06 \cdot 10^{-5}$	$4.09 \cdot 10^{-1}$
0.05	$6.17 \cdot 10^{-6}$	$1.40 \cdot 10^{-1}$
0.10	$4.90 \cdot 10^{-6}$	$8.80 \cdot 10^{-2}$
0.15	$4.28 \cdot 10^{-6}$	$6.72 \cdot 10^{-2}$
0.20	$3.89 \cdot 10^{-6}$	$5.55 \cdot 10^{-2}$
0.25	$3.61 \cdot 10^{-6}$	$4.78 \cdot 10^{-2}$
0.30	$3.40 \cdot 10^{-6}$	$4.23 \cdot 10^{-2}$

Tab. 5.7 Tempi di diffusione in funzione della distanza per diversi valori di ematocrito

Il tempo di passaggio del globulo all'interno del capillare dovrà essere almeno pari al tempo di diffusione. Per far sì che i pori sulla membrana rimangano aperti per un tempo sufficiente a favorire l'ingresso della molecola, il tempo di passaggio viene assunto pari a 1.5 volte il tempo di diffusione (Tab. 5.8). Questo valore considera anche il fatto che l'eritrocita assumerà una posizione più o meno definita e stabile all'interno del flusso laminare, quindi verrà sollecitato in modo efficace, ad una certa distanza dall'ingresso.

Il tempo di passaggio (t_{pass}) dipende dalla portata e viene calcolato considerando il rapporto tra la lunghezza del capillare ($L = 58.5$ mm) e la velocità media del profilo tridimensionale di velocità (V_{media}) fornita direttamente dal software (Tab. 5.8).

H_T	t_{diff} (s)	$t_{diff\ 1.5}$ (s)	Q ($\mu\text{l}/\text{min}$)	V_{media} (m/s)	t_{pass} (s)
0.01	$4.09 \cdot 10^{-1}$	$6.13 \cdot 10^{-1}$	14	0.09509	$6.152 \cdot 10^{-1}$
0.05	$1.40 \cdot 10^{-1}$	$2.10 \cdot 10^{-1}$	40	0.27528	$2.125 \cdot 10^{-1}$
0.10	$8.80 \cdot 10^{-2}$	$1.32 \cdot 10^{-1}$	64	0.44431	$1.317 \cdot 10^{-1}$
0.15	$6.72 \cdot 10^{-2}$	$1.01 \cdot 10^{-1}$	80	0.55640	$1.051 \cdot 10^{-1}$
0.20	$5.55 \cdot 10^{-2}$	$8.32 \cdot 10^{-2}$	100	0.69644	$8.399 \cdot 10^{-2}$
0.25	$4.78 \cdot 10^{-2}$	$7.17 \cdot 10^{-2}$	117	0.81411	$7.186 \cdot 10^{-2}$
0.30	$4.23 \cdot 10^{-2}$	$6.35 \cdot 10^{-2}$	132	0.91613	$6.386 \cdot 10^{-2}$

Tab. 5.8 Tempo di diffusione aumentato di un fattore 1.5 ($t_{diff\ 1.5}$), portata (Q), velocità media (V_{media}) e tempo di passaggio nel capillare (t_{pass})

I valori di portata presenti in tabella sono valori massimi oltre i quali non è più garantito il rispetto della disuguaglianza $t_{pass} \geq t_{diff\ 1.5}$ per quel valore di ematocrito.

Per ciascuna portata, applicando la legge di Casson, si ricavano gli sforzi di taglio medi (Tab. 5.9). I valori vengono forniti direttamente dal software una volta impostate le costanti di Casson per ciascun ematocrito.

H_T	Q ($\mu\text{l}/\text{min}$)	τ_{medio} (Pa)
0.01	14	17.95
0.05	40	61.30
0.10	64	115.52
0.15	80	168.86
0.20	100	245.73
0.25	117	333.01
0.30	132	432.60

Tab. 5.9 Sforzi di taglio medi (τ_{medio}) in funzione di portata ed ematocrito

Le coppie di valori τ - t da porre sul diagramma di Tillman sono rappresentate, per ciascun valore di ematocrito, da τ_{medio} e t_{pass} (Tab. 5.10, Fig. 5.11).

τ_{medio} (Pa)	t_{pass} (s)
17.95	$6.152 \cdot 10^{-1}$
61.30	$2.125 \cdot 10^{-1}$
115.52	$1.317 \cdot 10^{-1}$
168.86	$1.051 \cdot 10^{-1}$
245.73	$8.399 \cdot 10^{-2}$
333.01	$7.186 \cdot 10^{-2}$
432.60	$6.386 \cdot 10^{-2}$

Tab. 5.10 Coppie di valori τ - t

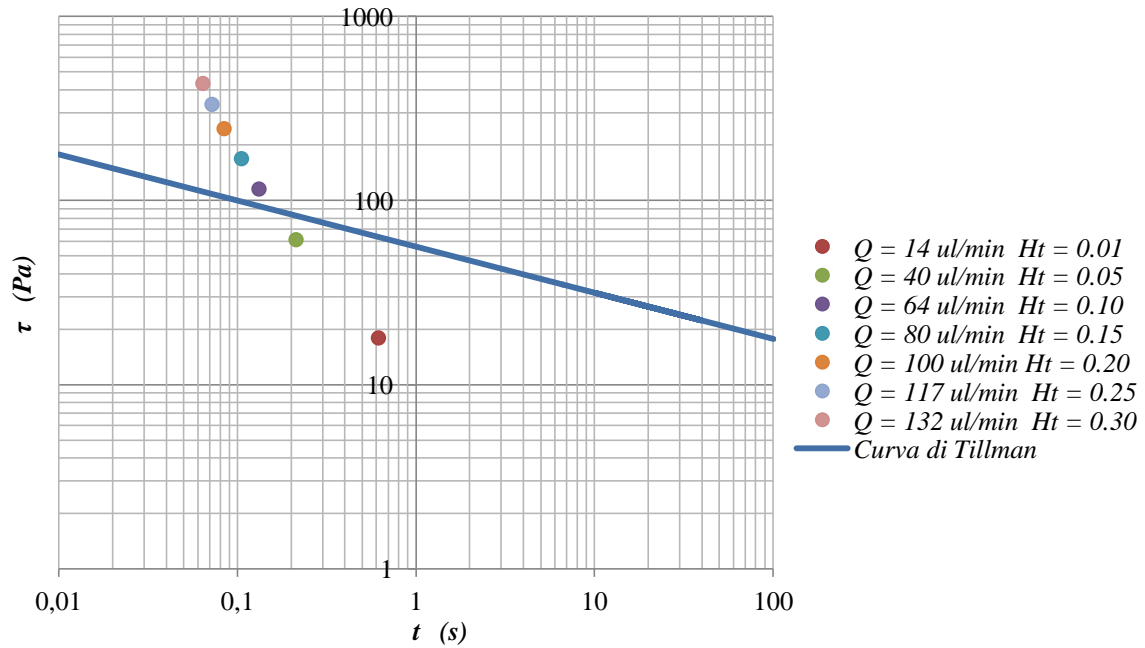


Fig. 5.11 Diagramma di Tillman e coppie di valori τ_{medio} - t_{pass}

Dal diagramma si nota come all'aumentare di Q e H_T aumenta lo sforzo di taglio medio agente sulle cellule e diminuisce il tempo di sollecitazione. Si ritiene che, per garantire un'elevata efficienza d'incapsulamento, lo shear stress medio debba posizionarsi in prossimità della curva di Tillman, come nel caso $Q = 40 \mu\text{l}/\text{min}$ e $H_T = 0.05$. Per questo motivo è possibile scegliere questa portata come valore di riferimento anche per ematocriti

superiori al 5% (Tab. 5.11). Si esclude il caso $H_T = 0.01$ perché un aumento di Q oltre 14 $\mu\text{l}/\text{min}$ porterebbe ad avere un tempo di passaggio minore del tempo di diffusione ($t_{\text{diff}_{1.5}}$).

H_T	Q ($\mu\text{l}/\text{min}$)	V_{media} (m/s)	t_{pass} (s)	τ_{medio} (Pa)
0.05	40	0.27528	$2.125 \cdot 10^{-1}$	61.30
0.10	40	0.27442	$2.132 \cdot 10^{-1}$	72.62
0.15	40	0.27362	$2.138 \cdot 10^{-1}$	85.45
0.20	40	0.27293	$2.143 \cdot 10^{-1}$	100.12
0.25	40	0.27234	$2.148 \cdot 10^{-1}$	116.64
0.30	40	0.27186	$2.152 \cdot 10^{-1}$	135.06

Tab. 5.11 Valori di velocità media (V_{media}), tempo di passaggio (t_{pass}) e sforzi di taglio medi (τ_{medio}), a parità di portata (Q) e al variare dell'ematocrito (H_T)

Le nuove coppie di valori $\tau_{\text{medio}}-t_{\text{pass}}$ vengono posizionate sul diagramma di Tillman (Fig. 5.12).

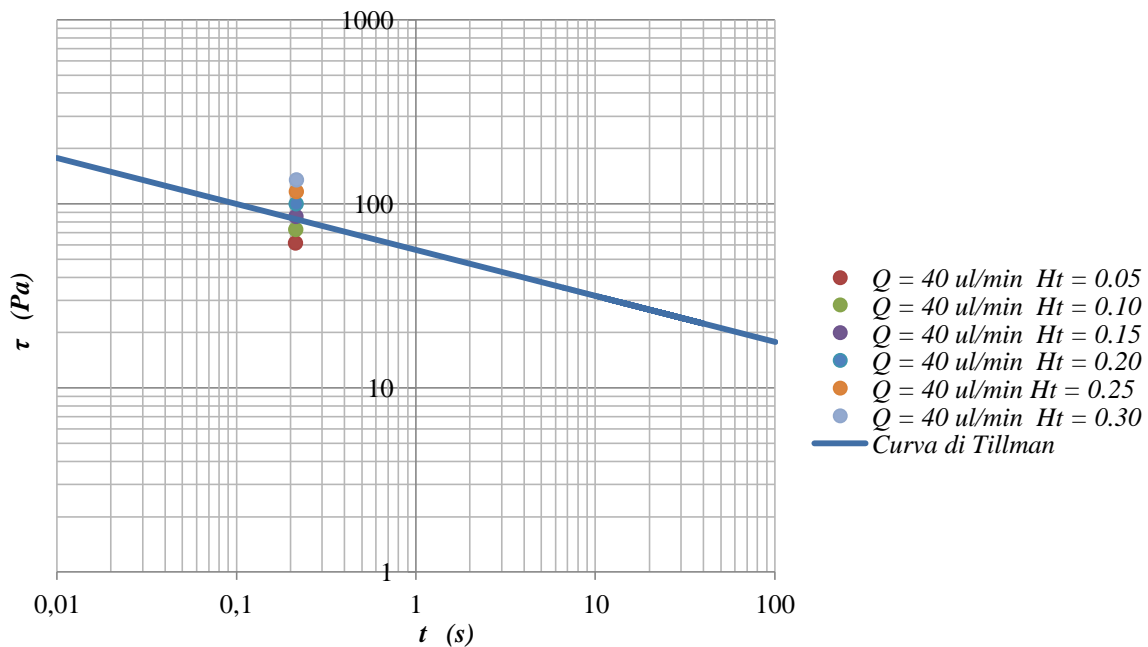


Fig. 5.12 Diagramma di Tillman e coppie di valori $\tau_{\text{medio}}-t_{\text{pass}}$

In ultima analisi è possibile valutare le perdite di carico tra ingresso e uscita del capillare (Tab. 5.12). I valori vengono forniti direttamente dal software.

H_T	Q ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Δp (Pa)
0.05	40	243540
0.10	40	278190
0.15	40	317120
0.20	40	373300
0.25	40	451850
0.30	40	563100

Tab. 5.12 Perdite di carico

Considerando le eventuali difficoltà nell'operare sperimentalmente con valori di Δp così elevati si è pensato, come possibile alternativa, di modificare la geometria aumentando l'area della sezione trasversale (le perdite di carico sono direttamente proporzionali alla portata, alla lunghezza del capillare, all'ematocrito e sono inversamente proporzionali all'area della sezione trasversale). Le nuove dimensioni sono riportate in tabella 5.13.

Lunghezza	Altezza	Profondità
58.5 mm	50 μm	2000 μm

Tab. 5.13 Dimensioni nuovo capillare

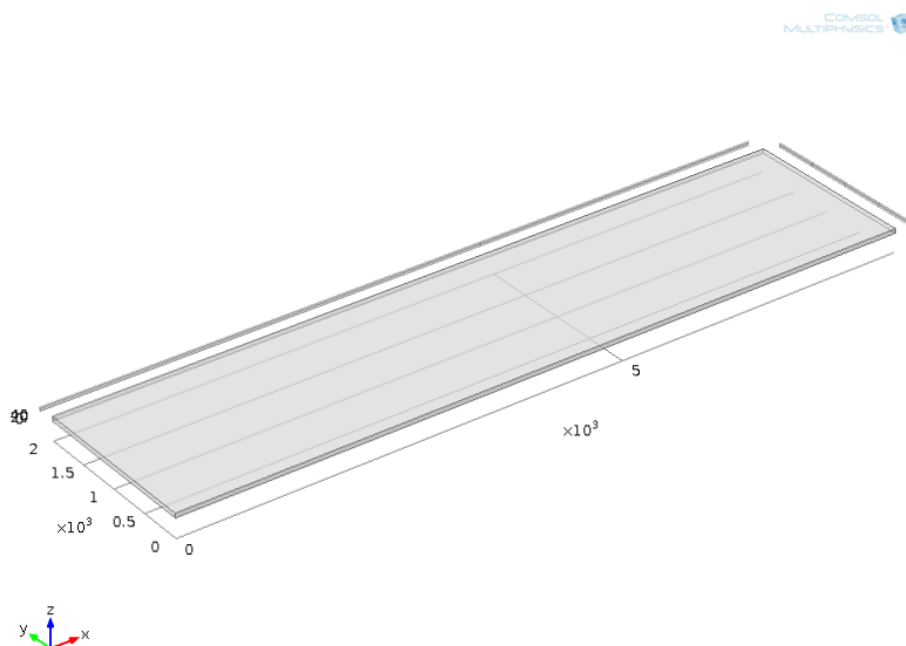


Fig. 5.13 Capillare a sezione rettangolare (per rendere comprensibile la geometria del condotto la lunghezza è stata ridotta di 7 volte rispetto al valore reale)

In questo caso, il set-up sperimentale dovrà prevedere un distributore che convogli il fluido dal tubo a sezione circolare proveniente dalla pompa a siringa all'ingresso a sezione rettangolare del capillare. Mentre in uscita un sistema analogo indirizzerà il flusso verso una riserva.

Applicando la stessa procedura vista in precedenza si ottengono i valori riportati in tabella 5.14.

H_T	t_{diff} (s)	$t_{diff 1.5}$ (s)	Q ($\mu\text{l}/\text{min}$)	V_{media} (m/s)	t_{pass} (s)	τ_{medio} (Pa)	Δp (Pa)
0.05	$1.40 \cdot 10^{-1}$	$2.10 \cdot 10^{-1}$	1600	0.26651	$2.195 \cdot 10^{-1}$	36.66	90118
0.10	$8.80 \cdot 10^{-2}$	$1.32 \cdot 10^{-1}$	1600	0.26651	$2.195 \cdot 10^{-1}$	43.86	103898
0.15	$6.72 \cdot 10^{-2}$	$1.01 \cdot 10^{-1}$	1600	0.26651	$2.195 \cdot 10^{-1}$	51.94	121530
0.20	$5.55 \cdot 10^{-2}$	$8.32 \cdot 10^{-2}$	1600	0.26650	$2.195 \cdot 10^{-1}$	61.12	144640
0.25	$4.78 \cdot 10^{-2}$	$7.17 \cdot 10^{-2}$	1600	0.26650	$2.195 \cdot 10^{-1}$	71.43	176064
0.30	$4.23 \cdot 10^{-2}$	$6.35 \cdot 10^{-2}$	1600	0.26650	$2.195 \cdot 10^{-1}$	82.91	220544

Tab. 5.14 Grandezze caratteristiche capillare rettangolare

Le coppie di valori τ_{medio} - t_{pass} vengono poste sul diagramma di Tillman per verificarne la posizione rispetto alla retta (Fig. 5.14).

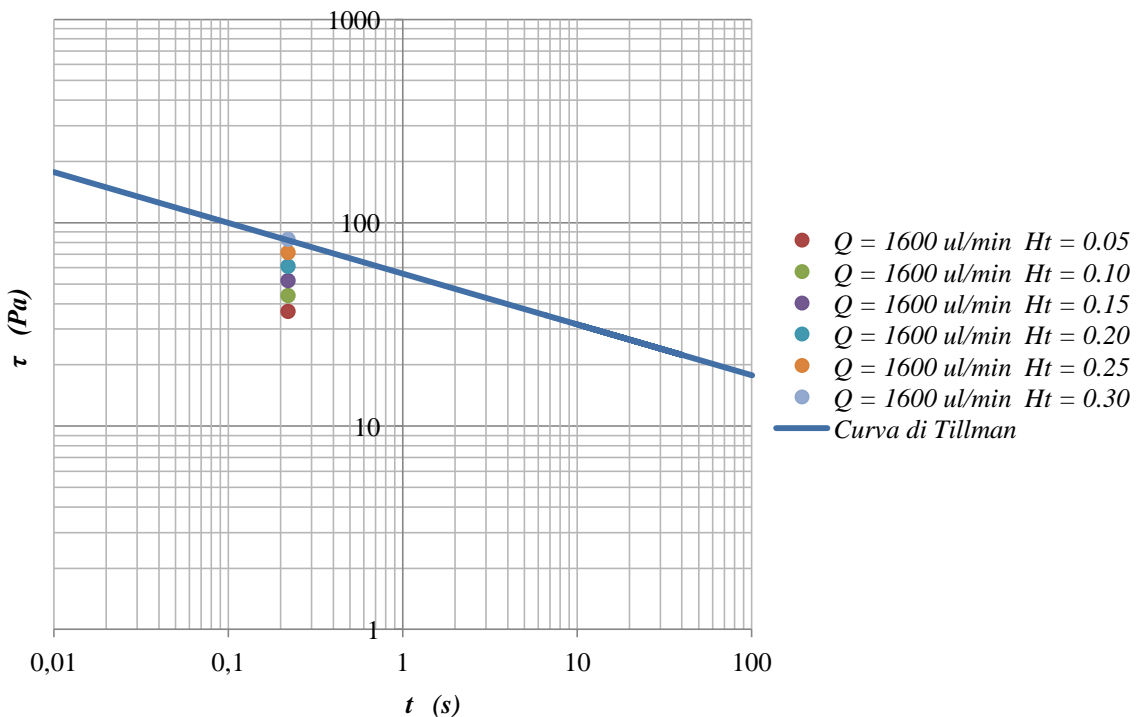


Fig. 5.14 Diagramma di Tillman e coppie di valori τ_{medio} - t_{pass}

5.4 Indice di efficacia

È possibile definire un indice con il quale identificare un'area, all'interno del condotto, a maggior efficacia d'incapsulamento. Questo indice garantisce il fatto che, se il globulo attraversa e mantiene il suo moto nella zona a maggior efficacia, allora si ha la certezza che l'incapsulamento avvenga.

L'indice è definito come il prodotto normalizzato tra lo sforzo di taglio, la frazione in volume della fase dispersa e la velocità (Fig. 5.15 e 5.16).

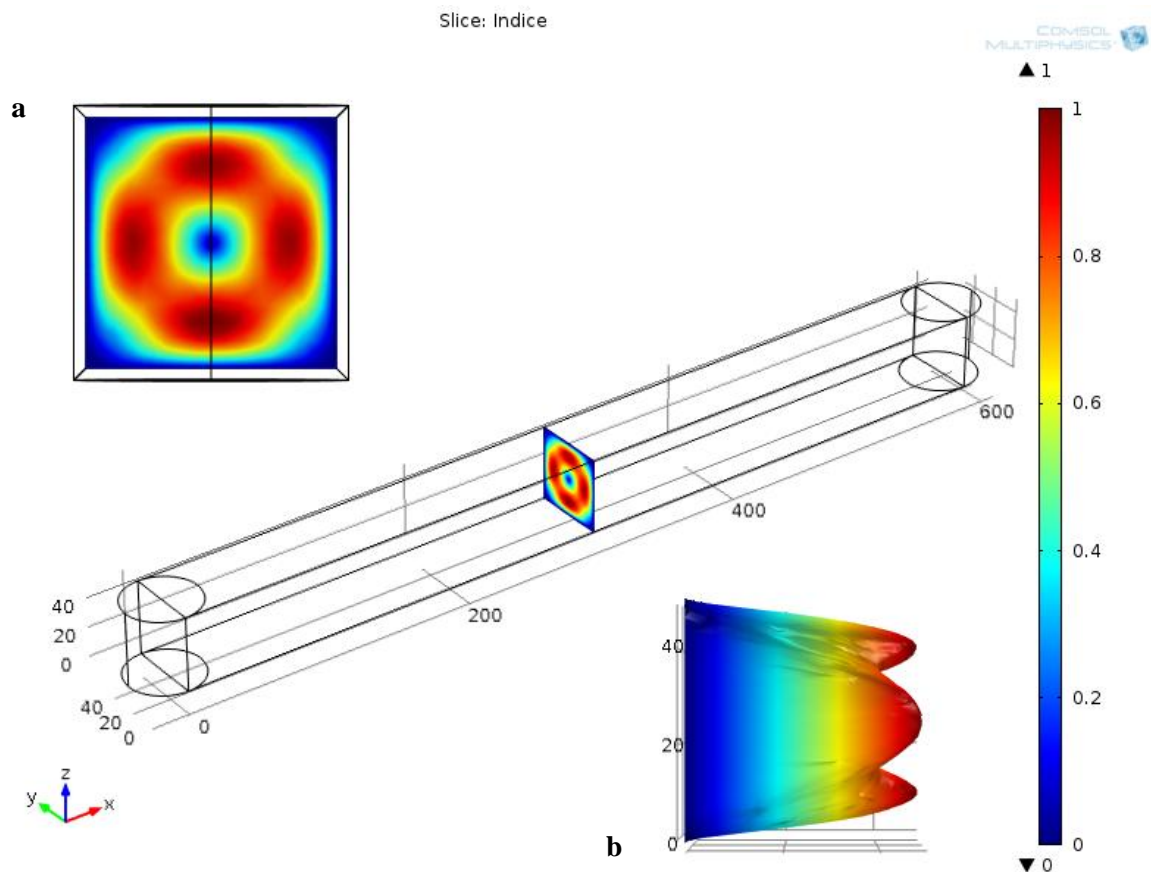


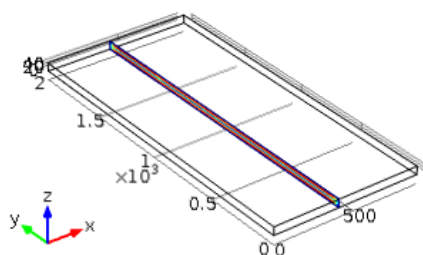
Fig. 5.15 Profilo e valori dell'indice di efficacia per il capillare a sezione quadrata ($Q = 40 \mu\text{l}/\text{min}$, $H_T = 0.05$): a. piano y-z; b. piano z-x (per rendere comprensibile la geometria del condotto la lunghezza è stata ridotta di 100 volte rispetto al valore reale)

La corona circolare, caratterizzata da valori compresi tra 0.8 e 1, identifica l'area a maggior efficacia d'incapsulamento.

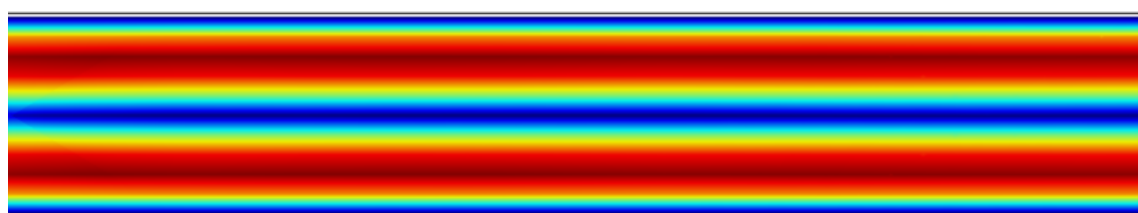
Slice: Indice

COMSOL
MULTIPHYSICS

a



b



▼ 0



▲ 1

Fig. 5.16 Profilo e valori dell'indice di efficacia per il capillare a sezione rettangolare ($Q = 1600 \mu\text{l}/\text{min}$, $H_T = 0.05$): a. visione complessiva del condotto (solo a scopo illustrativo la lunghezza del canale è stata ridotta di 64 volte rispetto al valore reale); b. piano z-y

Anche in questo caso la zona caratterizzata da valori compresi tra 0.8 e 1 rappresenta l'area a maggior efficacia d'incapsulamento.

6. DISCUSSIONE

6.1 Analisi preliminare e confronto con letteratura

Dai dati riportati in tabella 5.2 si nota come i valori di velocità ricavati sperimentalmente non si discostino molto rispetto da quelli ottenuti con simulazioni numeriche. A livello sperimentale il profilo di velocità viene ricavato utilizzando una tecnica di analisi basata su un sistema ottico chiamata micro-PIV (micro-Particle Image Velocimetry); essa è in grado di fornire il campo di velocità monitorando lo spostamento di particelle fluorescenti aggiunte al fluido [2].

Questa tecnica porta con sé una serie di errori nell'analisi, tra cui la difficoltà nell'escludere la fluorescenza delle particelle fuori dal piano focale. Tra i dati misurati, quindi, vi sono anche velocità relative a particelle appartenenti a piani vicini rispetto a quello di interesse [2].

Nei dati sperimentali si riscontrano alcune anomalie che confermerebbero quanto sopra:

- per $Q = 0.5 \mu\text{l/min}$, all'aumentare dell'ematocrito, la velocità massima aumenta anziché diminuire;
- raddoppiando la portata, a parità di ematocrito, la velocità raddoppia solo per $H_T = 0.05$ e non per $H_T = 0.01$.

Quanto detto ha conseguenze sulla valutazione dello scostamento (\mathcal{E}) tra valori sperimentali e computazionali (Tab. 6.1):

- a pari ematocrito, \mathcal{E} aumenta all'aumentare della portata, anche se non allo stesso modo per $Q = 0.25$ e $Q = 0.5$;
- a parità di portata, passando da $H_T = 0.01$ a $H_T = 0.05$, lo scostamento aumenta per $Q = 0.25 \mu\text{l/min}$ e diminuisce per $Q = 0.5 \mu\text{l/min}$.

Q ($\mu\text{l/min}$)	H_T	V_{max_exp} (mm/s)	V_{max_cfd} (mm/s)	\mathcal{E}
0.25	0.01	2.665	2.7741	3.93 %
0.50	0.01	5.082	5.5475	8.39 %
0.25	0.05	2.590	2.7731	6.60 %
0.50	0.05	5.103	5.5432	7.94 %

Tab. 6.1 Valori di velocità e scostamento per ciascuna prova ($\mathcal{E} = ((V_{max_cfd} - V_{max_exp}) / V_{max_cfd}) \cdot 100$)

Osservando i dati relativi agli sforzi di taglio e, in particolare, i valori ottenuti sperimentalmente (Tab. 5.3), è possibile notare come all'aumentare dell'ematocrito, a parità di portata, lo shear stress diminuisce per $Q = 0.25 \mu\text{l}/\text{min}$ e aumenta per $Q = 0.5 \mu\text{l}/\text{min}$. Questa contraddizione può essere spiegata solamente considerando il fatto che il profilo di velocità rilevato dalla micro-PIV veniva approssimato, per ciascuna delle 4 prove, in modo poco preciso. Le parabole ottenute mediante elaborazione in Excel® si discostavano molto dall'andamento reale del profilo di velocità. Inevitabilmente questo si ripercuote sul calcolo degli sforzi di taglio dando origine all'errore.

Un'altra inesattezza nel calcolo degli sforzi di taglio era legata al fatto che i coefficienti τ_0 e μ_c dell'equazione di Casson venivano mantenuti costanti ($\tau_0 = 10.89 \text{ mPa}$, $\mu_c = 2.75 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) anziché variare con l'ematocrito.

Durante le simulazioni computazionali i valori dello yield stress (τ_0) e della viscosità di Casson (μ_c) sono stati opportunamente modificati, a seconda del valore di ematocrito, secondo le formule 2.20 e 2.21 (Tab. 6.2).

H_T	τ_0 (mPa)	μ_c (mPa·s)
0.01	0	1.895
0.05	49.521	2.112

Tab. 6.2 Valori di yield stress (τ_0) e viscosità di Casson (μ_c) al variare dell'ematocrito

Questo garantisce, a parità di portata, un aumento degli sforzi di taglio all'aumentare dell'ematocrito (Tab. 5.3).

Dal confronto con i valori sperimentali si nota come, per H_T pari a 0.05, lo sforzo di taglio ottenuto a livello computazionale sia più alto. Considerando invece i dati relativi ad $H_T = 0.01$, $\tau_{\text{max_cfd}}$ è minore rispetto ai valori sperimentali.

Sembrirebbe quindi che mantenere costanti i valori di τ_0 e μ_c produca una sottostima degli sforzi di taglio per $H_T = 0.05$ e una sovrastima per $H_T = 0.01$.

Questi risultati però non si possono spiegare solo alla luce dei cambiamenti effettuati sui coefficienti di Casson. Come già detto, si ritiene che l'elaborazione del profilo di velocità secondo i metodi seguiti nello studio precedente non consenta una corretta valutazione del valore degli sforzi di taglio. Il profilo di velocità rilevato dalla micro-PIV viene

approssimato con un andamento parabolico non abbastanza preciso (ad esempio il valore di velocità massima reale è molto maggiore rispetto a quello approssimato); questa imprecisione si riflette poi sulla determinazione dello shear rate e, in seguito, degli sforzi di taglio.

6.2 Prove di ottimizzazione

Per aumentare efficacia ed efficienza d'incapsulamento all'interno del capillare a sezione quadrata rispetto alle precedenti prove sperimentali [2], risulta necessario aumentare i valori di portata. Questo comporta un aumento dell'entità degli sforzi di taglio e una diminuzione del tempo di passaggio all'interno del capillare. Per evitare l'emolisi è necessario mantenere le coppie di valori τ - t medi in prossimità della retta di Tillman senza oltrepassarla.

Si identificano in $Q = 40 \mu\text{l}/\text{min}$ e $H_T \leq 0.15$, i valori più adeguati per rispettare queste prerogative (Fig. 5.12).

È possibile che l'alto valore delle perdite di carico tra ingresso e uscita possa comportare problemi durante l'esecuzione di prove sperimentali. L'elevato valore di pressione potrebbe dar luogo più che ad un danneggiamento del capillare in sé, ad una perdita della tenuta delle connessioni con eventuali tubi di collegamento (immaginando un set-up costituito da una pompa a siringa, un tubo di collegamento e un capillare).

Per questo motivo si propone come alternativa l'utilizzo di un capillare a sezione rettangolare.

Aumentare l'area della sezione trasversale variando solo la profondità del condotto consente di ridurre le perdite di carico e, nello stesso momento, di non alterare eccessivamente l'entità degli sforzi di taglio.

In questo caso si identifica in $Q = 1600 \mu\text{l}/\text{min}$ e H_T compreso tra 0.05 e 0.30, la condizione di sollecitazione migliore (Fig. 5.14).

La portata rispetto al caso precedente aumenta di 40 volte, questo perché l'area della sezione trasversale è aumentata a sua volta della stessa entità mentre la velocità media è rimasta pressoché la stessa.

Se si volessero ridurre ulteriormente le perdite di carico basterebbe aumentare la profondità del capillare e trovare il valore di Q più appropriato che garantisce il posizionamento nei pressi della retta di Tillman.

Sia per il capillare a sezione quadrata che per quello a sezione rettangolare, le portate sono molto superiori rispetto a quelle che caratterizzavano le prove sperimentali del precedente lavoro di tesi (0.25 e 0.50 $\mu\text{l}/\text{min}$). In vista della realizzazione di un dispositivo caratterizzato da più canali in parallelo questo rappresenta un vantaggio in quanto riduce, a parità di portata totale, il numero di condotti in parallelo.

Non solo, portate più alte permettono di evitare l'accumulo di globuli rossi sul fondo del capillare. Questo fenomeno, spesso presente a livello sperimentale, è confermato anche dalle simulazioni numeriche.

In figura 6.1 si osserva il progressivo aumento della frazione in volume della fase dispersa depositata sul fondo. Aumentando la portata, a parità di ematocrito, questo fenomeno scompare (Fig. 6.2).

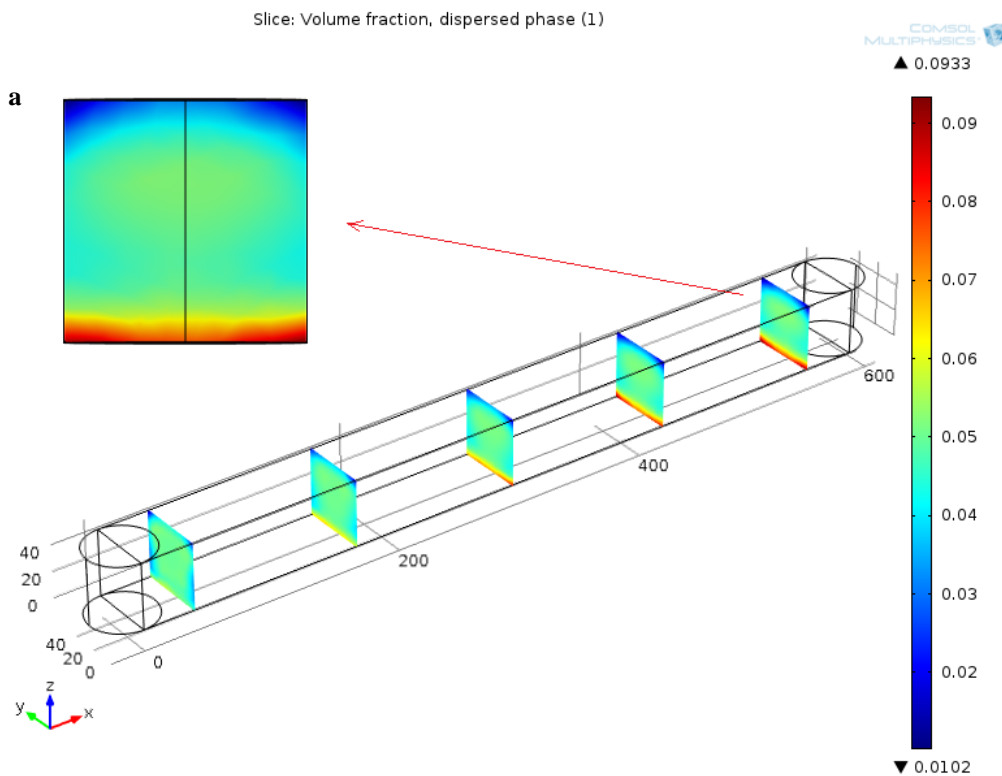


Fig. 6.1 *Frazione in volume della fase dispersa per $Q = 0.25 \mu\text{l}/\text{min}$ e $H_T = 0.05$: a. piano y-z, si nota la presenza di deposito sul fondo (per rendere comprensibile la geometria del condotto la lunghezza è stata ridotta di 100 volte rispetto al valore reale)*

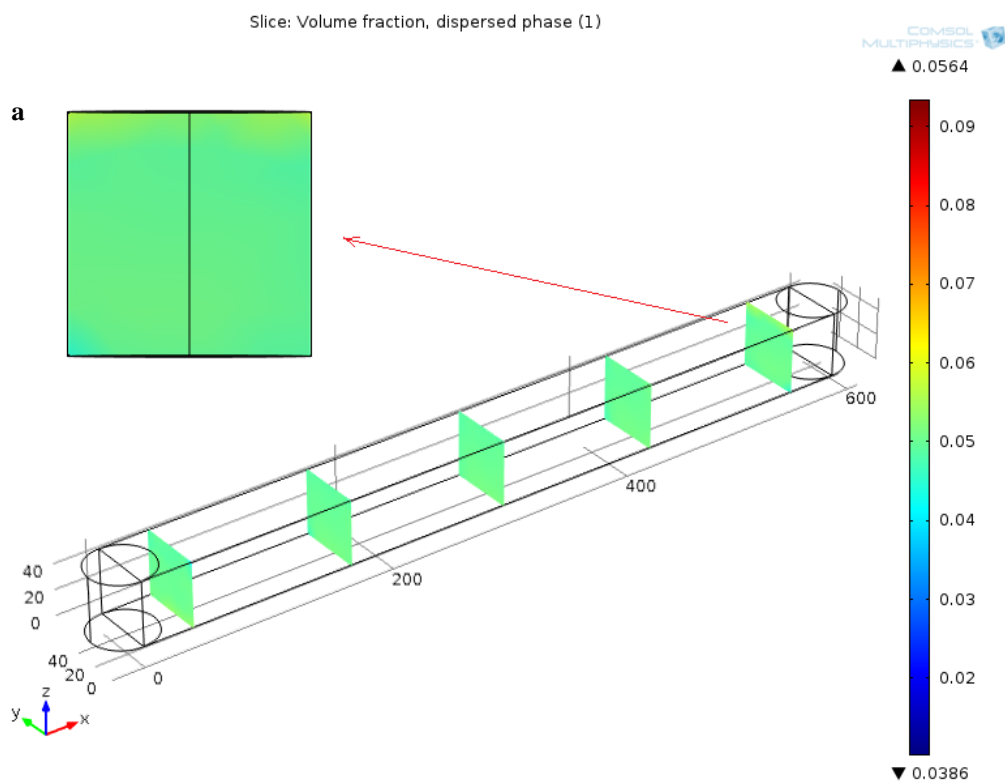


Fig. 6.2 *Frazione in volume della fase dispersa per $Q = 40 \mu\text{l}/\text{min}$ e $H_T = 0.05$: a. piano y-z, si nota l'assenza di deposito sul fondo (per rendere comprensibile la geometria del condotto la lunghezza è stata ridotta di 100 volte rispetto al valore reale)*

È possibile rilevare l'eventuale accumulo sul fondo osservando la traiettoria delle particelle in moto nel capillare. Si riscontra anche in questo caso la presenza di deposito per basse portate (Fig. 6.3), cosa che non avviene per portate superiori (Fig. 6.4).

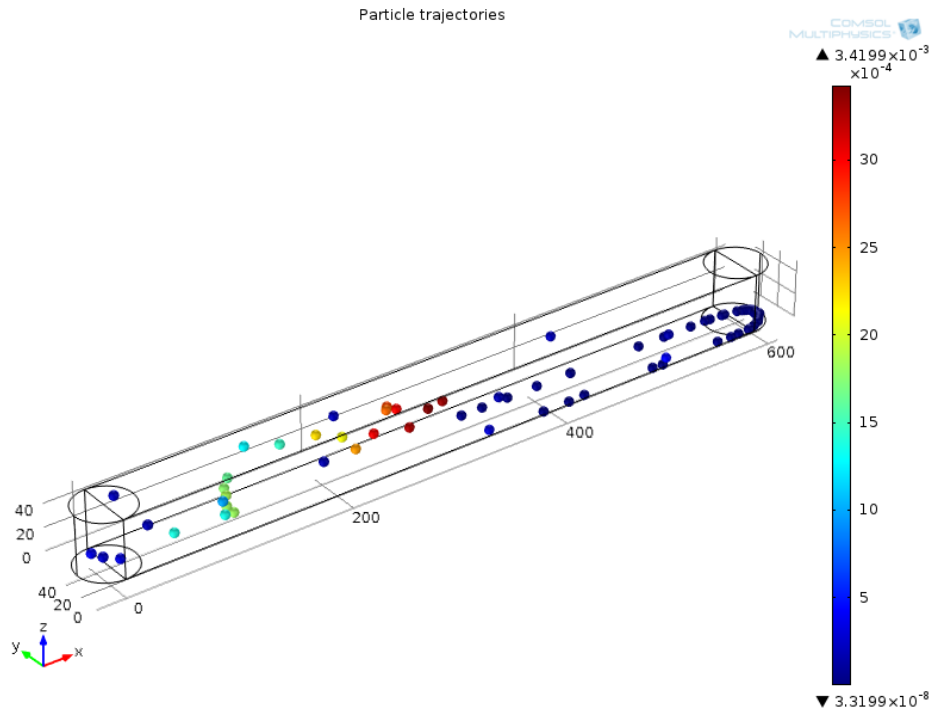


Fig. 6.3 Posizione e velocità delle particelle in un certo istante per $Q = 0.25 \mu\text{l}/\text{min}$ e $H_T = 0.05$, in blu le particelle con velocità nulla depositate sul fondo (per rendere comprensibile la geometria del condotto la lunghezza è stata ridotta di 100 volte rispetto al valore reale)

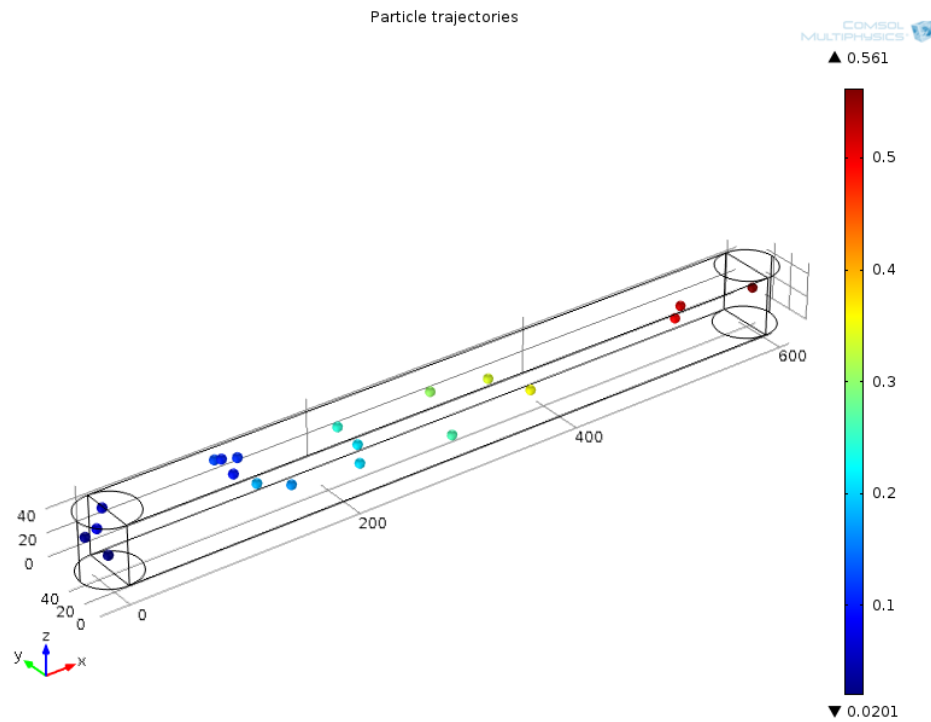


Fig. 6.4 Posizione e velocità delle particelle in un certo istante per $Q = 40 \mu\text{l}/\text{min}$ e $H_T = 0.05$, si nota l'assenza di particelle depositate (per rendere comprensibile la geometria del condotto la lunghezza è stata ridotta di 100 volte rispetto al valore reale)

Nelle varie simulazioni numeriche, così come nell'elaborazione dei dati, si è scelto di limitare l'ematocrito al di sotto del 30%. A livello sperimentale è noto che all'aumentare dell'ematocrito aumentano le difficoltà di analisi. Ad esempio, nel lavoro di tesi precedente, per ridurre i problemi di rilevazione usando la micro-PIV si limitava l'ematocrito massimo al 5% [2].

Mantenendo costante la portata e aumentando l'ematocrito, aumenta progressivamente l'entità degli sforzi di taglio (Fig. 5.12 e 5.14). Si può sfruttare questo andamento per comprendere meglio in corrispondenza di quale valore di shear stress medio hanno inizio fenomeni di tipo emolitico. Questo consentirebbe di avere ben chiaro fino a che punto è possibile avvicinarsi alla retta di Tillman senza dar luogo a emolisi.

Osservando i dati relativi a V_{media} e t_{pass} per il capillare a sezione quadrata e per quello a sezione rettangolare (Tab. 5.11 e 5.14), si nota come nel primo caso all'aumentare dell'ematocrito la velocità diminuisce e i tempi aumentano, nel secondo caso la velocità e i tempi rimangono pressoché costanti. L'aumento dell'area della sezione trasversale comporterebbe quindi una diminuzione dell'influenza della parte corpuscolata sul profilo di velocità del fluido e quindi sui tempi di passaggio.

I tempi di diffusione (t_{diff} e $t_{diff_{1.5}}$) sono uguali per entrambi i tipi di capillare perché il volume rappresentativo non cambia al variare del volume totale del capillare, come dimostrato dall'equazione 4.53.

La scelta di una portata costante ($Q = 40 \mu\text{l}/\text{min}$ nel caso di capillare a sezione quadrata e $Q = 1600 \mu\text{l}/\text{min}$ nel caso a sezione rettangolare) e minore delle portate massime ammissibili consente di avere tempi di passaggio molto superiori ai tempi di diffusione. Questo è tanto più vero quanto più aumenta l'ematocrito: man mano che aumenta H_T diminuisce il tempo di diffusione (t_{diff} e $t_{diff_{1.5}}$), quindi aumenta la differenza rispetto al tempo di passaggio definito dalla portata (t_{pass}). Maggiore è il tempo di passaggio rispetto al tempo di diffusione e più alta è la probabilità di avere incapsulamento.

6.3 Indice di efficacia

Numerosi studi hanno ormai dimostrato come avviene il posizionamento di globuli rossi all'interno di canali micrometrici. Nell'esecuzione di questo lavoro è invece emersa la necessità di conoscere quali zone interne al capillare, se attraversate dalle cellule, sono in grado di garantire l'incapsulamento.

Per questo motivo, è stato definito un indice che consente di individuare l'area all'interno del condotto a maggior efficacia d'incapsulamento. Si può dire che ciascun globulo che attraversa e mantiene il suo moto nella zona a maggior efficacia, subirà l'incapsulamento delle molecole probanti.

L'indice (I_e) è ottenuto a partire dal prodotto normalizzato tra lo sforzo di taglio, la frazione in volume della fase dispersa e la velocità. Ognuna di queste grandezze dà un contributo diverso: l'andamento degli sforzi di taglio identifica la distribuzione della sollecitazione all'interno del flusso; la frazione in volume della fase dispersa fornisce un'indicazione delle zone interessate dalla presenza di particelle; la velocità, essendo nulla in parete, esclude eventuali globuli depositati e riduce l'importanza delle zone in prossimità della stessa dove in genere si forma uno strato privo di eritrociti (cfr par. 2.8.3). L'indice assume un valore compreso tra 0 e 1.

Nel caso del capillare a sezione quadrata, l'area a maggior efficacia d'incapsulamento è rappresentata da una corona circolare posta tra il centro e le pareti del canale (Fig. 5.15). In questa zona, caratterizzata dall'indice che assume valori compresi tra 0.8 e 1, agiscono velocità e sforzi tangenziali medi. I valori di queste grandezze, siccome sono stati presi come riferimento nei calcoli, garantiscono un tempo di passaggio del globulo nel capillare maggiore del tempo di diffusione della molecola e permettono di avere sforzi di taglio prossimi alla retta di Tillman. Rappresentano dunque le condizioni ottimali per l'incapsulamento.

Spostandosi verso il centro del capillare, I_e diminuisce tendendo ad un valore nullo: quest'area è caratterizzata da bassi sforzi di taglio e alte velocità che non favoriscono l'apertura dei pori sulla membrana e la diffusione delle molecole all'interno degli eritrociti.

In prossimità della parete, invece, gli sforzi di taglio sono massimi e le velocità tendono a zero, nonostante ciò l'indice è molto basso. I_e tiene conto della formazione dello strato privo di globuli in parete oltre che della tendenza degli eritrociti a spostarsi verso il centro del capillare durante il loro moto.

Lo stesso ragionamento può essere applicato al caso del capillare a sezione rettangolare (Fig. 5.16).

In figura 6.5 si nota come I_e assuma valori compresi tra 0.8 e 1 (maggior efficacia d'incapsulamento), tra 0.4 e 0.8 volte il raggio idraulico ($R = 25\mu\text{m}$), con un picco a circa $r = 0.6R$. Questo vale per entrambi i tipi di capillare.

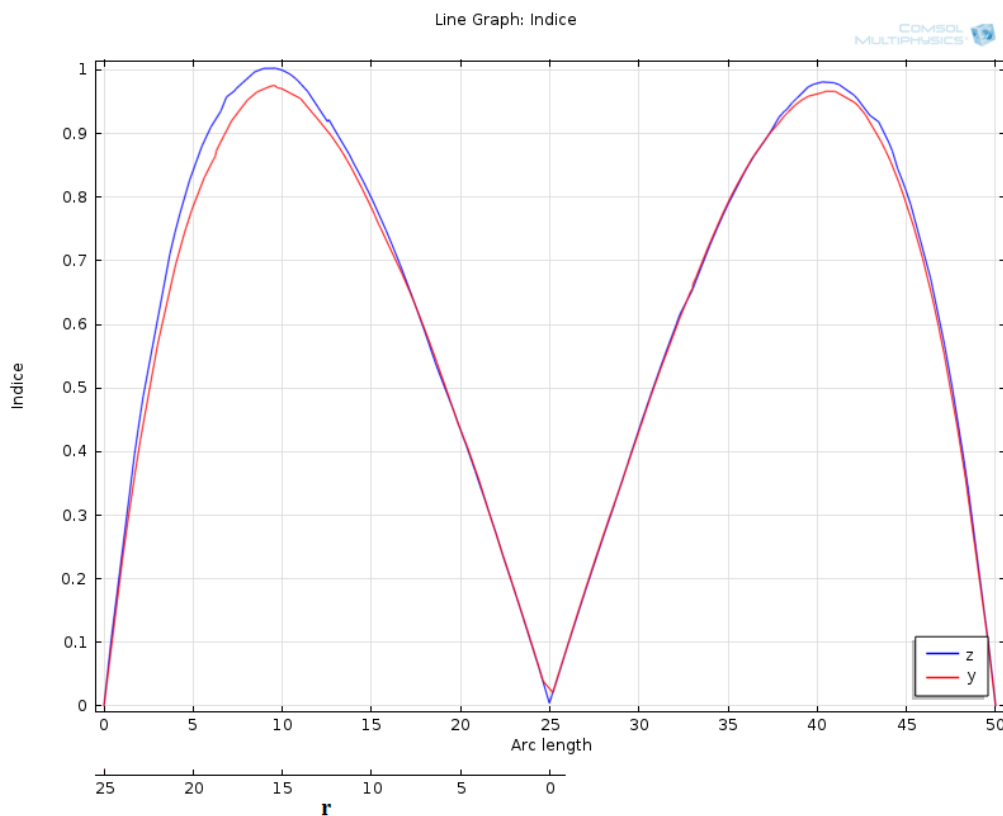


Fig. 6.5 Profili e valori di I_e in direzione y ($x = 58.5/2 \text{ mm}$, $z = 25 \mu\text{m}$) e in direzione z ($x = 58.5/2 \text{ mm}$, $y = 25 \mu\text{m}$), per $Q = 40 \mu\text{l/min}$ e $H_T = 0.05$ (capillare a sezione quadrata)

In uno studio recente è stato analizzato il moto di eritrociti all'interno di condotti circolari ($\varnothing = 150 \mu\text{m}$) per diversi valori di velocità. Le prove sperimentali erano eseguite

considerando tre diverse tipologie di sospensioni: sangue intero, globuli rossi e PBS, globuli rossi fissati con glutaraldeide e PBS. In tutti tre i casi, per valori di shear rate superiori a 150 s^{-1} , si sviluppa il cosiddetto “tubular pinch effect” ovvero si identifica una maggior concentrazione di globuli rossi in determinate zone del capillare ad una certa distanza dal centro. Nei casi in esame si riscontrava una maggior presenza di cellule ad una distanza dal centro del condotto pari a circa 0.6 volte il raggio [39].

In un altro studio condotto usando un canale a sezione rettangolare ($100 \times 5000 \mu\text{m}$), veniva utilizzata una sospensione di globuli in PBS con ematocriti inferiori all’1%. Anche in questo caso, per alti valori di shear rate, si identificava la tendenza dei globuli a concentrarsi ad una distanza dal centro pari a 0.6 volte la dimensione minore ($100 \mu\text{m}$) [40].

Un ulteriore studio, effettuato utilizzando capillari in vetro di diametro pari a 50 e $100 \mu\text{m}$, ha analizzato la dispersione radiale dei globuli durante il loro moto variando l’ematocrito tra 2 e 35%. In questo caso, gli eritrociti si concentrano maggiormente in una zona compresa tra 0.4 e 0.8 volte il raggio, soprattutto per valori di H_T maggiori del 9% [41].

Nel nostro caso, date le alte portate in gioco, lo shear rate si aggira attorno a $5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ per il capillare a sezione quadrata e $3 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ per il capillare a sezione rettangolare. La geometria dei nostri capillari è molto simile e comparabile a quella delle prove sperimentali riportate sopra, così come i valori di ematocrito.

Si può quindi affermare che l’area a maggior efficacia d’incapsulamento coincide con l’area a maggior concentrazione di globuli. Questo garantisce non solo il fatto che l’incapsulamento avviene ma anche che può coinvolgere un numero elevato di eritrociti.

6.4 Limiti dei modelli

I modelli di flusso utilizzati, sebbene abbiano consentito di studiare al meglio la fluidodinamica all’interno del capillare, non sono in grado di riprodurre completamente il comportamento del sangue.

Ciascun modello presenta dei limiti che comportano inevitabilmente l’adozione di una serie di approssimazioni.

Il “Mixture Model” considera una fase dispersa caratterizzata da particelle rigide e sferiche. I globuli rossi sono, invece, cellule altamente deformabili e discoidali. La deformabilità e la morfologia degli eritrociti influenza il moto delle cellule stesse, l’interazione con le altre cellule, la resistenza meccanica alle sollecitazioni tangenziali.

Solo in parte è possibile ovviare a questa limitazione ad esempio modificando il parametro ϕ_m nel modello di viscosità di Krieger (cfr par. 4.4.7). Così facendo, almeno da un punto di vista matematico, si cerca di avvicinare il comportamento di particelle rigide e sferiche a quello reale.

In parte è anche possibile trascurare questa limitazione sapendo che a livello sperimentale è stato dimostrato un comportamento identico tra particelle rigide e deformabili per quanto riguarda la disposizione degli eritrociti nel capillare (cfr par. 6.3).

In ogni caso, la cosa migliore sarebbe quella di riuscire a riprodurre a livello computazionale morfologia e proprietà meccaniche del globulo.

Il “Mixture Model”, inoltre, non consente la visualizzazione delle particelle e della loro traiettoria. La presenza di globuli in un certo punto del volume del condotto è stimata matematicamente fornendo un valore puntuale della frazione in volume della fase dispersa.

Il “Particle Tracing for Fluid Flow Model” consente di visualizzare la traiettoria di particelle sferiche, ma non prende in considerazione le possibili interazioni tra le stesse.

Inoltre, risulta difficile riprodurre la tendenza delle cellule a spostarsi verso le aree a maggior concentrazione di eritrociti. Questo perché le particelle seguono le linee di flusso fornite come input dal “Laminar Flow Model” senza mai spostarsi.

7. CONCLUSIONI

L'incapsulamento di molecole in eritrociti è un ambito di ricerca in continua evoluzione. L'applicazione di sollecitazioni meccaniche per indurre l'apertura di pori sulla membrana cellulare e permettere il caricamento dei suddetti farmaci, risulta essere uno dei metodi innovativi di queste ricerche e in questo ambito è possibile inquadrare il presente lavoro di tesi.

Tramite un modello computazionale è stata riprodotta la fluidodinamica del sangue in microcanali, valutando il profilo di velocità e la distribuzione degli sforzi di taglio. Nel filone di lavori riguardanti il tema, questo è il primo studio in cui sia stato sviluppato un modello computazionale, che ha consentito di identificare le condizioni ottimali per ottenere incapsulamento. Le portate sono state scelte in modo da garantire sforzi di taglio subemolitici e tempi di sollecitazione maggiori del tempo necessario alla molecola per diffondere all'interno del globulo. Tramite la definizione di un indice di efficacia è stato possibile identificare l'area all'interno del condotto a maggior efficacia d'incapsulamento.

La complessità del comportamento reologico del sangue ha portato inevitabilmente all'utilizzo di ipotesi semplificative. Nei modelli numerici sviluppati ciascun eritrocita è considerato sferico e rigido, anziché discoidale e deformabile. Con i software utilizzati non è stato inoltre possibile riprodurre l'interazione tra le particelle all'interno del fluido.

Sarà importante in futuro superare i limiti dei modelli per avvicinarsi il più possibile al comportamento reale del sangue, ovvero riprodurre la morfologia e le proprietà meccaniche del globulo, tutte le forze agenti responsabili della migrazione radiale e i fenomeni di interazione tra le cellule. Inoltre, dovranno essere eseguite prove sperimentali al fine di validare le considerazioni fatte per l'ottimizzazione dell'incapsulamento.

BIBLIOGRAFIA

[1] T. Cornegliani, U. Scaioni, B. Venturi. Enciclopedia della medicina. De Agostini Editore, Novara 2003.

[2] D.G. D'Urso. Studio reologico del sangue in micro capillari: lo sforzo di taglio, fattore incapsulante di molecole in eritrociti. Tesi di Laurea, Scuola di Ingegneria dei Sistemi, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano, A.A. 2010-2011.

[3] C. Canale, A. Federici. Progetto e realizzazione di un nuovo set-up per l'incapsulamento di molecole in eritrociti. Tesi di Laurea, Facoltà di Ingegneria dei Sistemi, Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano, A.A. 2006-2007.

[4] F. Boselli, F. Clavica. Analisi teorico-sperimentale della morfologia e della permeabilità della membrana del globulo rosso. Tesi di Laurea, Facoltà di Ingegneria, Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano, A.A. 2005-2006.

[5] R. Bedolessi, O. Piazzai. Effetti della sollecitazione meccanica sulla permeabilità dello stroma a molecole probanti. Tesi di Laurea, Facoltà di Ingegneria, Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica, Dipartimento di Bioingegneria, Politecnico di Milano, A.A. 2003-2004.

[6] W.H. Reinhart, S. Chien. Red Cell rheology in stomatocyte-echinocyte transformation: roles of cell. Geometry and cell shape. Grune & Stratton.

[7] Rand R.P., Burton A.C., 1964. Mechanical properties of the red cell membrane. I. Membrane stiffness and intracellular pressure. Biophys J 4, 115-136.

- [8] Rand R.P., 1964. Mechanical properties of the red cell membrane. II. Viscoelastic breakdown of the membrane. *Biophys J* 4, 303-316.
- [9] G. Cianci. Effetti emolitici della fluidodinamica del sangue in dispositivi biomedicali: analisi dello stato dell'arte. Tesi di Laurea, Dipartimento di Bioingegneria, Politecnico di Milano Anno accademico 2001-2002.
- [10] Suter S. P. 1997. Brief reviews Flow-induced Trauma to blood Cells. *Circulation Research* Vol.4
- [11] Robert M. Johnson. 1994. Membrane Stress Increases Cation Permeability in Red Cells *Biophysical Journal*. 67: 1876-1881
- [12] Canham, P.B.(1970) *J. Theoret. Biol.* 26, 61-81
- [13] Peck-Sun Lin 1981. Electron microscopic study of hemolysis: a proposal of formation of a weak structural region in the erythrocyte membrane. *Cell Biology International reports* 5 (2)
- [14] Cereda R.. Emolisi: analisi sperimentale e modello fluidodinamico. Tesi di laurea, Dipartimento di Bioingegneria, Politecnico di Milano, Anno Accademico 1990-1991.
- [15] Bayliss L.E., 1962. "The rheology of blood". In: *American Physiological Society Handbook*. Washington, DC: American Physiological Society.
- [16] Y.C. Fung. *Biomechanics Mechanical Properties of Living Tissues*, seconda edizione; Springer, 1993.
- [17] D. Carugo. Development of microfluidic systems for therapeutic applications. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy, 2012, Bioengineering Sciences Research Group, Faculty of Engineering and the Environment, University of Southampton.

- [18] I.M. Krieger, T.J. Dougherty; 1950. A mechanism for non-newtonian flow in suspensions of rigid spheres. Transactions of the society of rheology, III, 137-152.
- [19] Sara Biagiotti, Maria Filomena Paoletti, Alessandra Fraternali, Luigia Rossi and Mauro Magnani. Drug Delivery by Red Blood Cells, *Life*, 63(8): 621–631, August 2011
- [20] F. Pierigè, S. Serafini, L. Rossi, M. Magnani. Cell-based drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 286–295
- [21] Muzykantov V.R., 2010. Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by Mother Nature. *Expert Opin Drug Deliv.* 7(4): 403-427.
- [22] Hamidi M., Tajerzadeh H., Dehpour A.R., Rouini M.R. – In Vitro Characterization of Human Intact Erythrocytes Loaded by Enalaprilat. *Drug Delivery* 2001; 8: 223 – 230.
- [23] Hamidi M., Tajerzadeh H., 2003. Carrier Erythrocytes: An Overview. *Drug Deliv.* 2003 Jan-Mar;10(1):9-20.
- [24] Magnani M., Bianchi M., Rossi L., Stocchi V. – Human red blood cells as bioreactors for the release of 2',3'- dideoxycytidine an inhibitor of HIV infectivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989; 164 (1): 446-452.
- [25] Rongcong Luo, Shailender Mutukumaraswamy, Subbu S. Venkatraman, Björn Neu, Engineering of erythrocyte-based drug carriers: control of protein release and bioactivity, *J Mater Sci: Mater Med* (2012) 23:63–71
- [26] Weaver J.C., Harrison G.I., Bliss J.G., Mourant J.R., Powell K.T. Electroporation: high frequency of occurrence of a transient high-permeability state in erythrocytes and intact yeast. *FEBS Letters* 1988; 229 (1): 30-34
- [27] Harisa G.E.I., Ibrahim M.F., Alanazi F.K. Characterization of Human Erythrocytes as Potential Carrier for Pravastatin: An In Vitro Study. *Int. J. Med. Sci.* 2011; 8(3):222-230.

[28] Magnani M. Erythrocyte Engineering for Drug Delivery and Targeting; LANDES BIOSCIENCE, 2003.

[29] Millán C.G., Castañeda A.Z., Marinero M.L., Lanao J.M. – Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. *Journal of controlled release* 2004; 95: 27-49.

[30] Shavi G.V., Doijad R.C., Deshpande P.B., Manvi FV, Meka S.R., Udupa N., Omprakash R., Dhirendra K. Erythrocytes as carrier for prednisolone: in vitro and in vivo evaluation. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2010; 23(2): 194-200.

[31] Millán C.G., Castañeda A.Z., Marinero M.L., Lanao J.M. Factors associated with the performance of carrier erythrocytes obtained by hypotonic dialysis. *Blood cells, molecules and diseases* 2004; 33: 132 – 140.

[32] Noel-Hocquet S., Jabbouri S., Lazar S., Maunier J.C., Guillaumet G., Ropars C. Erythrocytes as carriers of new anti-opioid prodrugs: in vitro studies. *Advances in experimental medicine and biology* 1992; 326: 215-221.

[33] Kirch H.J., Sheffield C., DeLoach J.R. Susceptibility of carrier erythrocytes to a natural hemolytic system. *Advances in experimental medicine and biology* 1992; 326: 341– 345

[34] G. I. Harisa, M. F. Ibrahim, F. K. Alanazi. Erythrocyte-mediated delivery of pravastatin: in vitro study of effect of hypotonic lysis on biochemical parameters and loading efficiency. *Arch Pharm Res* Vol 35, No 8, 1431-1439, 2012

[35] S.C. Ritter, M.A. Milanick, K.E. Meissner. Encapsulation of FITC to monitor extracellular pH: a step towards the development of red blood cells as circulating blood analyte biosensors. *Biomedical Optics Express*, Vol. 2, No. 7, 2012.

- [36] M. Foroozesh, M. Hamidi, A. Zarrin, S. Mohammadi-Samani, H. Montaseri. Preparation and in-vitro characterization of tramadol-loaded carrier erythrocytes for long-term intravenous delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63: 322-332, 2011.
- [37] S. Biagiotti, L. Rossi, M. Bianchi, E. Giacomini, F. Pierigè, G. Serafini, P.G. Conaldi, M. Magnani. Immunophilin-loaded erythrocytes as a new delivery strategy for immunosuppressive drugs. *Journal of Controlled Release* 154 (2011) 306-313.
- [38] E. Briones, C.I. Colino, J.M. Lanao. Study of the factors influencing the encapsulation of zidovudine in rat erythrocytes. *International Journal of Pharmaceutics* 401 (2010) 41-46.
- [39] Moger J., Matcher J. S., Winlove C. P., Shore A. 2004. Measuring red blood cell flow dynamics in a glass capillary using Doppler optical coherence tomography and Doppler amplitude optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics* 9(5): 982–994
- [40] Uijtewaal W. S., Nijhof E.J., Heethaar R. 1994. Lateral migration of blood cells and microspheres in two- dimensional Poiseuille flow: a laser doppler study. *Journal of Biomechanics* 27: 35-42.
- [41] R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai, M. Takeda, S. Wada, T. Yamaguchi. Radial dispersion of red blood cells in blood flowing through glass capillaries: The role of hematocrit and geometry. *Journal of Biomechanics* 41 (2008) 2188-2196.