

POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



**STUDIO COMPUTAZIONALE E VALIDAZIONE SPERIMENTALE  
DEGLI EFFETTI DEL FLUSSO CONFINATO SULLA  
SOLLECITAZIONE MECCANICA DI ERITROCITI, FINALIZZATA  
ALL'INCAPSULAMENTO DI MOLECOLE PROBANTI**

Relatore: Prof. Ing. Maria Laura COSTANTINO

Correlatore: Dott. Ing. Giustina CASAGRANDE

Dott. Ing. Monica PIERGIOVANNI

Tesi di Laurea di:

Andrea D'Amato Matr. 799150

Lorenzo Cantaluppi Matr. 800785

Anno Accademico 2013-2014

Si ringrazia Giustina Casagrande per il supporto fornito durante lo svolgimento della tesi,  
Monica Piergiovanni e Elena Bianchi per la disponibilità durante le fasi finali del lavoro.

# INDICE

<b>SOMMARIO .....</b>	<b>IV</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>X</b>
<b>INTRODUZIONE E OBIETTIVI.....</b>	<b>1</b>
<b>1 - IL SANGUE.....</b>	<b>3</b>
1.1 FUNZIONI E COMPOSIZIONE .....	3
1.1.1 Plasma .....	3
1.1.2 Componente corpuscolata .....	4
1.2 REOLOGIA DEL SANGUE.....	6
1.2.1 Proprietà reologiche del sangue .....	7
1.2.1.1 Massa volumica.....	7
1.2.1.2 Viscosità .....	7
1.2.2 Microcircolazione.....	10
1.2.2.1 Effetto Fahraeus - Lindqvist.....	11
1.2.2.2 Effetto Fahraeus .....	12
1.2.2.3 <i>Cell Depletion Layer</i> .....	14
1.3 EMOLISI .....	15
1.3.1 Emolisi non fisiologica.....	15
1.3.2 Emolisi meccanica.....	16
1.3.3 Meccanismi di emolisi meccanica in un tubo .....	17
1.3.4 Invecchiamento cellulare.....	18
1.4 DANNO SUB - EMOLITICO.....	18
1.5 STROMA .....	21
1.5.1 Membrana plasmatica .....	21
1.5.2 Citoscheletro.....	23
1.5.3 Trasformazioni morfologiche.....	23
1.5.4 Proprietà meccaniche dello stroma.....	25
1.6 CONSERVAZIONE DEL SANGUE.....	29
1.6.1 Procedura di ottenimento dei concentrati eritrocitari .....	29
1.6.2 Anticoagulanti e conservanti .....	30
1.6.3 Conservazione di globuli rossi allo stato liquido .....	30
1.6.4 Ottenimento della soluzione anticoagulante - conservante .....	31
<b>2 - TECNICHE DI INCAPSULAMENTO .....</b>	<b>32</b>
2.1 INTRODUZIONE .....	32
2.2 INCAPSULAMENTO IN GLOBULI ROSSI .....	33
2.3 APPLICAZIONI TERAPEUTICHE .....	36
2.4 TECNICHE DI INCAPSULAMENTO .....	36
2.4.1 Elettroporazione .....	36
2.4.2 Endocitosi indotta farmacologicamente .....	38
2.4.3 Metodi basati su processi osmotici.....	38

2.4.3.1 Metodo dell'impulso osmotico.....	39
2.4.3.2 Emolisi ipotonica.....	40
2.4.4 Incapsulamento mediante sforzi di taglio.....	43
2.5 CONFINAMENTO DI PARTICELLE IN DISPOSITIVI MICROFLUIDICI .....	46
2.6 VALUTAZIONE DELLE PROVE DI INCAPSULAMENTO.....	48
<b>3 - MATERIALI E METODI.....</b>	<b>49</b>
3.1 MODELLO COMPUTAZIONALE .....	49
3.1.1 Descrizione generale del modello computazionale .....	49
3.1.1.1 Geometria, materiali e mesh.....	50
3.1.1.2 Condizioni di esercizio.....	53
3.1.2 Mixture Model, Laminar Flow.....	53
3.1.2.1 Condizioni iniziali .....	54
3.1.2.2 Condizioni al contorno .....	54
3.1.2.3 Mixture Viscosity Model .....	55
3.1.3 Laminar Flow Model.....	56
3.1.3.1 Condizioni al contorno .....	56
3.2 MODELLO DI DIFFUSIONE DELLA MOLECOLA.....	57
3.2.1 Distanza di diffusione.....	57
3.2.2 Tempo di diffusione .....	59
3.3 PROTOCOLLO DI PROVA: TENUTA DEL CIRCUITO .....	60
3.3.1 Prova 1 .....	62
3.3.2 Prova 2 .....	63
3.3.3 Prova 3 .....	64
3.3.4 Prova 4 .....	66
3.3.5 Prova 5 .....	67
3.4 OTTIMIZZAZIONE DEI PARAMETRI.....	68
3.4.1 Individuazione delle massime portate centrali applicabili .....	69
3.4.2 Ottimizzazione dell'incapsulamento: selezione delle prove .....	70
3.5 ANALISI FLUIDODINAMICA: MICROPIV .....	75
3.5.1 Principio di funzionamento .....	75
3.5.2 Apparato sperimentale.....	76
3.5.3 Acquisizione delle immagini.....	79
3.5.4 <i>Post - processing</i> dei dati: 2 - <i>Frame Cross - Correlation</i> .....	80
3.5.5 <i>Pre - processing</i> e <i>post - processing</i> .....	83
3.6 PROTOCOLLO DI PROVA: VALIDAZIONE DEL MODELLO COMPUTAZIONALE.....	84
3.6.1 Preparazione della soluzione .....	84
3.6.2 Svolgimento delle prove.....	85
3.6.3 Elaborazione dei dati.....	87
3.6.3.1 Calibrazione e maschera.....	87
3.6.3.2 <i>Processing</i> .....	88
3.6.3.3 Visualizzazione dei dati.....	90
<b>4 - RISULTATI .....</b>	<b>92</b>
4.1 RISULTATI DEL MODELLO COMPUTAZIONALE.....	92
4.1.1 Profilo di velocità.....	92

4.1.2 Linee di flusso .....	95
4.1.3 Shear stress .....	96
4.1.4 Accumulo della fase dispersa .....	97
4.1.5 Indice di efficacia .....	98
<b>4.2 PROVE DI TENUTA DEL CIRCUITO .....</b>	<b>100</b>
4.2.1 Prova 1 .....	100
4.2.2 Prova 2 .....	101
4.2.3 Prova 3 .....	102
4.2.4 Prova 4 .....	104
4.2.5 Prova 5 .....	106
<b>4.3 OTTIMIZZAZIONE DEI PARAMETRI: SCELTA DELLE PROVE SPERIMENTALI .....</b>	<b>107</b>
<b>4.4 PROVE DI VALIDAZIONE DEL MODELLO COMPUTAZIONALE .....</b>	<b>109</b>
4.4.1 Prova $\alpha$ .....	109
4.4.2 Prova $\beta$ .....	110
4.4.3 Prova $\gamma$ .....	111
4.4.4 Prova $\delta$ .....	112
<b>5 - DISCUSSIONE .....</b>	<b>114</b>
5.1 MODELLO COMPUTAZIONALE .....	114
5.2 PROVE DI VALIDAZIONE DEL MODELLO COMPUTAZIONALE .....	115
5.2.1 Prova $\alpha$ .....	115
5.2.2 Prova $\beta$ .....	118
5.2.3 Prova $\gamma$ .....	119
5.2.4 Prova $\delta$ .....	121
<b>6 - CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI .....</b>	<b>126</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>128</b>
CAPITOLO 1 .....	128
CAPITOLO 2 .....	130
CAPITOLO 3 .....	133
<b>APPENDICE .....</b>	<b>128</b>
I - MODELLO COMPUTAZIONALE - “COPPIE SFORZO - TEMPO” .....	128
Ia - $H_t = 1\%$ .....	128
Ib - $H_t = 5\%$ .....	129
Ic - $H_t = 10\%$ .....	130
II - MODELLO COMPUTAZIONALE - “PERDITE DI CARICO” .....	131
IIa - $H_t = 1\%$ .....	131
IIb - $H_t = 5\%$ .....	132
IIc - $H_t = 10\%$ .....	133
III - MODELLO COMPUTAZIONALE - “NUMERI DI REYNOLDS” .....	134

## SOMMARIO

Il presente lavoro di tesi si pone nell'ambito dello studio dei sistemi a rilascio controllato di farmaci. Negli ultimi anni, l'utilizzo di eritrociti quali vettori è stato oggetto di numerosi studi nel settore universitario e industriale. La loro particolare struttura anucleata, abbinata alla loro capacità di raggiungere ogni distretto corporeo, li rende, infatti, efficaci trasportatori di molecole verso specifici organi bersaglio.

Recentemente è stato dimostrato che l'applicazione di stimoli fisici e/o chimici sulla superficie eritrocitaria causa la formazione di porosità temporanee che permettono la diffusione di molecole probanti all'interno della membrana. Terminata l'applicazione dello stimolo, le porosità si chiudono e tali molecole rimangono intrappolate all'interno dell'eritrocita. Il rilascio controllato di farmaco viene garantito dalla successiva emolisi, naturale o indotta.

Studi recenti hanno dimostrato l'efficacia di tale processo d'incapsulamento tramite l'applicazione di sforzi di taglio sulla membrana eritrocitaria, in virtù dello scorrimento di fluido all'interno di canali di dimensioni micrometriche.

Tali studi sono orientati alla realizzazione di un dispositivo d'incapsulamento applicabile in linea al paziente, in grado, dunque, di somministrare farmaci secondo vie alternative rispetto a quelle tradizionali e con modalità mirata, permettendo ad essi di agire nell'organo o nel tessuto bersaglio senza compromettere altre funzioni corporee.

Il presente studio si propone l'obiettivo di svolgere un'analisi computazionale e sperimentale dell'efficacia di applicazione della tecnica del flusso confinato nell'ambito dell'incapsulamento di farmaci in eritrociti tramite l'applicazione di sforzi di taglio in microcanali.

In primo luogo, è stata effettuata un'analisi computazionale mediante l'utilizzo del software COMSOL Multiphysics 4.2a (COMSOL AB, Stockholm, Sweden), all'interno del quale è stata riprodotta la geometria del canale microfluidico con triplo ingresso a croce (sezione 50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$  e lunghezza complessiva 87 mm), i fluidi di lavoro (fluido centrale costituito

da una miscela RBC-PBS e fluidi di confinamento costituiti da PBS), le tre diverse percentuali di confinamento della portata centrale (25%, 50% e 75%) e i diversi valori di ematocrito (1%, 5% e 10%).

Il modello computazionale scelto per riprodurre nella maniera più fedele la fluidodinamica d'interesse è il "Mixture Model", in grado di valutare il comportamento di fluidi caratterizzati da particelle solide disperse in una fase liquida. Le grandezze d'interesse risolte sono la velocità, la frazione della fase dispersa e le pressioni sviluppate. Tramite l'utilizzo di appropriati coefficienti distinti per ematocrito, è stato possibile ricavare lo sforzo di taglio a livello della sezione di confinamento applicando la relazione di Casson.

Terminata la realizzazione del modello computazionale, sono stati individuati i due requisiti fondamentali per poter definire le condizioni di lavoro da applicare nelle prove sperimentali:

- gli sforzi di taglio e i tempi di sollecitazione devono essere tali da garantire l'apertura dei pori sulla membrana e da impedire l'emolisi dei globuli rossi; studi precedenti hanno mostrato come un adeguato posizionamento dei valori  $\tau - t$  sia nell'intorno della curva di Tillmann;
- il tempo in cui i pori rimangono aperti dev'essere sufficiente per garantire alla molecola di diffondere all'interno dell'eritrocita.

E' stato creato, dunque, un modello di diffusione sulla base del quale è stato assegnato a ciascun eritrocita un volume cubico di fluido di dimensioni dipendenti dall'ematocrito. L'applicazione della legge di Fick ha permesso di valutare il tempo e, di conseguenza, la massima portata centrale ammissibile necessaria a garantire con sicurezza il fenomeno di diffusione della molecola probante all'interno dell'eritrocita. Sono stati così ottenuti nove valori di portate, distinti per ematocrito e per percentuale di confinamento.

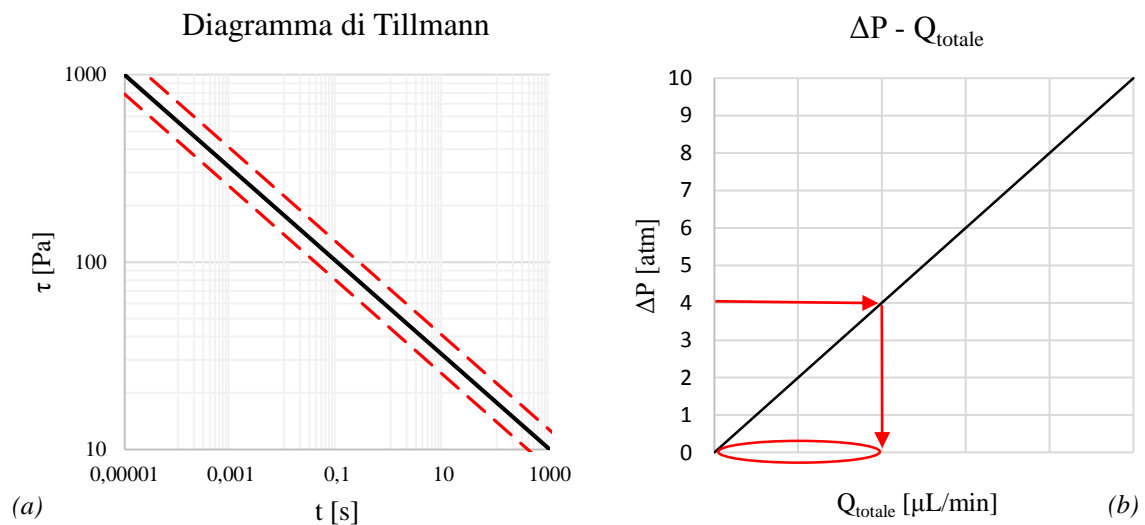
Sono state effettuate delle prove di tenuta del circuito, al fine di individuare la massima portata totale applicabile e, dunque, in grado di non provocare la perdita delle connessioni. Sono state studiate diverse configurazioni circuitali sino ad individuare l'assetto definitivo

per le successive prove di validazione del modello computazionale. E' stato definito un valore  $\Delta P_{\text{limite}}$  pari a 4 atm, corrispondente alla massima portata totale applicabile.

La fase di ottimizzazione dei parametri è stata effettuata al fine di selezionare definitivamente le condizioni di lavoro da applicare nelle prove sperimentali di incapsulamento. E' stato definito un criterio di selezione basato sullo studio di due parametri:

- la distanza nel piano bilogaritmico tra il generico punto di lavoro e la retta di Tillmann;
- la perdita di carico a cavallo del microcapillare.

Nel dettaglio, si è scelto di verificare che il modulo della distanza tra il generico punto di lavoro e la retta di Tillmann fosse minore rispetto a un valore di soglia definito (Figura Ia) e che la perdita di carico a livello del microcanale fosse inferiore al valore limite calcolato nelle prove di tenuta del circuito, pari a 4 atm (Figura Ib).



**Figura I** - Diagramma di Tillmann e intervallo di accettabilità definito (a) e grafico  $\Delta P - Q_{\text{totale}}$  utilizzato per la verifica del requisito pressorio (b)



In Tabella I vengono riportate le prove selezionate sulla base del criterio descritto:

**Tabella I** - Prove selezionate per l'attività sperimentale d'incapsulamento

Numero prova	Ht	% confinamento	Q <sub>centrale</sub> [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Q <sub>laterali</sub> [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]
1	5%	25%	14,83	22,25
2	5%	50%	27,88	13,94
3	5%	75%	38,78	6,46
4	10%	25%	13,29	19,94
5	10%	50%	25,41	12,71
6	10%	75%	36,13	6,02

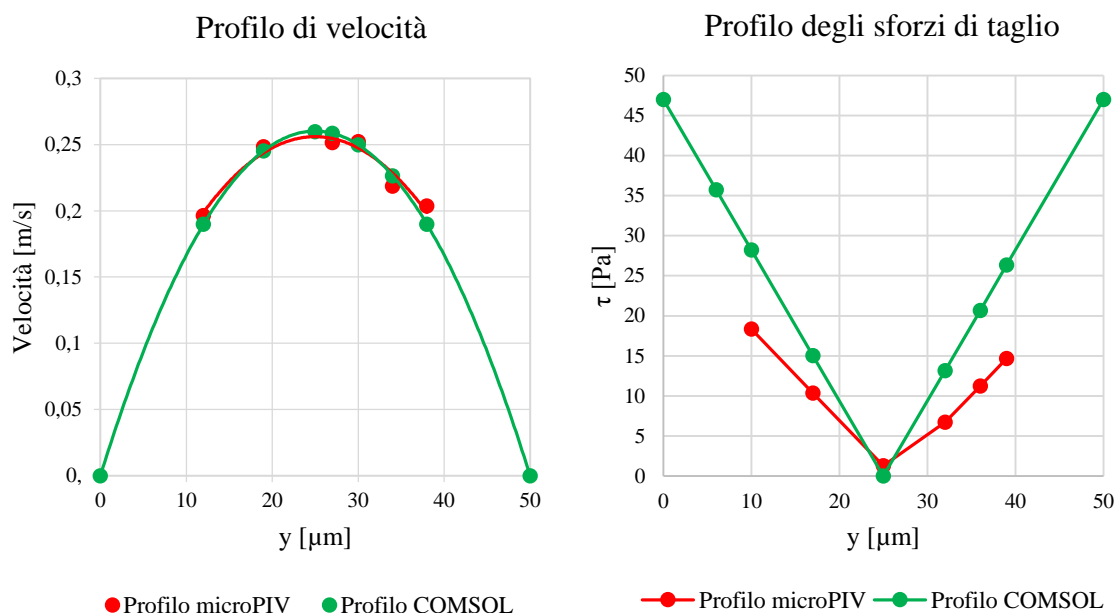
L'attività sperimentale effettuata ha riguardato la validazione del modello computazionale attraverso l'analisi fluidodinamica nel microcanale, eseguita tramite l'utilizzo di una microPIV (*micro Particle Image Velocimetry*). È stato riprodotto il set-up sperimentale, costituito da due pompe a siringa, tre siringhe in vetro, tubi di connessione in silicone e un microcapillare in PMMA con sezione interna  $50 \times 50 \mu\text{m}$ . Il sistema della  $\mu\text{PIV}$  consente di misurare profili di velocità in domini di dimensioni micrometriche, sulla base di un sistema ottico che permette di registrare in coppie di immagini lo spostamento di particelle traccianti nel fluido in movimento. Utilizzando specifici algoritmi di cross correlazione, è possibile calcolare da ogni coppia di immagini la velocità istantanea. Il risultato può essere ottimizzato se la densità delle particelle traccianti è la stessa di quella del fluido e se le particelle stesse sono sufficientemente piccole da seguire il flusso senza alterarlo. Tramite il software INSIGHT 3G (TSI, MN, US) sono stati impostati tutti i parametri necessari per le prove di validazione. Le caratteristiche principali delle prove scelte sono riportate in Tabella II:

**Tabella II** - Prove selezionate per la validazione del modello computazionale

Nome prova	Ht	% confinamento	Q <sub>centrale</sub> [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Q <sub>laterali</sub> [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]
Prova $\alpha$	5%	50%	10	5
Prova $\beta$	1%	25%	6	9
Prova $\gamma$	1%	50%	10	5
Prova $\delta$	1%	75%	14	2,3

Per ciascuna prova effettuata, l'immagine relativa al campo vettoriale elaborato dal software TECPLOT ha permesso di valutare l'avvenuto confinamento (e l'entità dello stesso) e la velocità massima, paragonando i valori ottenuti a quelli attesi. La scarsa concentrazione delle particelle traccianti ha costituito, tuttavia, un problema per l'analisi dei dati. E' stato infine ricavato il profilo di velocità tramite Excel sulla base dei dati forniti dalla  $\mu$ PIV, mentre gli sforzi di taglio sono stati calcolati con la relazione di Casson.

In Figura II è riportato, per una specifica prova selezionata, il confronto tra il profilo di velocità ricavato dai dati sperimentali e il profilo di velocità ricavato dal modello computazionale. In Figura III, viene presentato il medesimo confronto in merito agli sforzi di taglio. E' possibile osservare come il profilo di velocità mostri un andamento parabolico, tipico di un moto laminare, mentre il profilo degli sforzi di taglio, coerentemente alle aspettative, presenta valori massimi in prossimità della parete e valore nullo al centro del capillare.



**Figura II** - Profilo di velocità relativo alla Prova  $\delta$

**Figura III** - Profilo degli sforzi di taglio relativo alla Prova  $\delta$

Le Figure II e III mostrano come il modello sovrastimi i valori reali, limitatamente per la velocità e più significativamente per gli sforzi di taglio. Ciò viene attribuito alle stringenti

ipotesi effettuate durante la fase di modellizzazione. In particolare, il problema è da attribuire all'approssimazione relativa alla meccanica, alla morfologia e alla reologia globulare.

In prospettiva di studi futuri, si consiglia lo sviluppo di un modello che tenga in considerazione le caratteristiche meccaniche e morfologiche del globulo rosso. Si consiglia, inoltre, per quanto riguarda le prove da effettuare alla  $\mu$ PIV con la medesima geometria e con la tecnica del flusso confinato, l'utilizzo di una soluzione eritrocitaria con una maggiore concentrazione di particelle traccianti in polistirene.

## **SUMMARY**

The present work arises in the study of systems in controlled drug release. Recently, the use of erythrocytes as carriers has been the subject of numerous studies in the academic and in the industrial sectors. Their particular structure without the nucleus, linked to their ability to reach every area of the body, makes them, in fact, effective carriers of large amount of molecules to specific target organs.

Recently, it has been discovered that the application of physical and/or chemical stimuli on the erythrocytes' surface causes the formation of temporary porosity that allows the diffusion of generic molecules within the membrane. After the application of the stimulus, the pores close themselves and these molecules remain trapped inside of the erythrocyte. The gradual release of drug is guaranteed by the natural or induced hemolysis.

Recent studies demonstrated the effectiveness of the process of encapsulation through the application of shear stress acting on the erythrocyte's membrane as a consequence of the flow inside of channels of micrometric dimensions.

The purpose of these studies is to design a device which can be connected in line to the patient, able, therefore, to give drugs according to alternative pathways compared to the traditional ones and with an innovative targeted mode, allowing them to act in the organ or in the target tissue without compromising the other body functions.

The present study aims to analyze the effectiveness of the confined flow technique, applied to the encapsulation of drugs in erythrocytes through the application of shear stress in microchannels, by using a computational model and then validating it with experimental studies.

A first computational analysis has been made by the use of the software "COMSOL Multiphysics 4.2a" (COMSOL AB, Stockholm, Sweden). It has been designed the geometry of the microfluidic channel with a triple crossed entrance (section  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$  and overall length 87 mm). Then it have been set the fluids' specifics (central fluid consisting of a mixture RBC-PBS and the confinement fluid constituted by PBS), three different

percentages of confinement of the central flow (25%, 50% and 75%) and three different hematic rates (1%, 5% and 10%).

The computational model able to reproduce as faithfully as possible the fluid of interest is the "Mixture Model", able to evaluate the behavior of fluids composed by solid particles dispersed in a liquid phase. The variables of interest solved by the model are the velocity magnitude, the volume fraction of the dispersed phase and the pressure. By using appropriate coefficients for different hematic rates, it has been possible to obtain the shear stress by applying Casson's equation.

Once made the computational model, it has been made a preliminary phase of definition of the correct working conditions by the use of two fundamental parameters:

- the shear stress and the time it's applied must be in a certain range to ensure the opening of the pores on the membrane of the red blood cells but also not to cause hemolysis. Previous studies have shown that the best positioning of the  $\tau - t$  values is near Tillmann's line;
- the time the pores are open must be enough to ensure the molecule to diffuse inside the erythrocyte's membrane.

Therefore, it has been developed a diffusion model based on which it has been assigned to each erythrocyte a cubic volume of fluid sized depending on the hematic rate. The application of Fick's law allowed to evaluate the time and, consequently, the maximum allowable central flow rate necessary to ensure the phenomenon of diffusion of the generic molecule among the erythrocyte's membrane. As a result, nine values of flow rates were obtained, each different from the other for hematic rate and percentage of focusing.

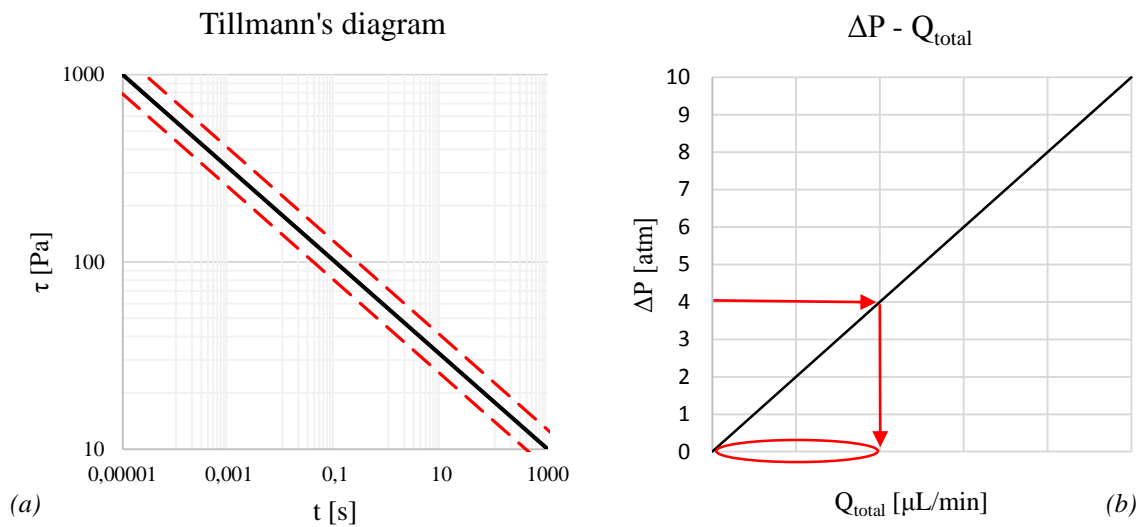
Afterwards, a head loss test has been made in order to identify the maximum total flow rate, which is supported by the circuit, and, therefore, that doesn't cause the loss of the connections. Different circuit configurations were studied until it has been found the final arrangement for the subsequent validation tests of the computational model. The maximum

head loss value that has been evaluated is equal to 4 atm, corresponding to the maximum total flow rate applicable.

The phase of the parameters' optimization has been made in order to finally select the working conditions to be applied in the experimental tests of encapsulation. It has been defined a selection method based on the study of two basic parameters:

- the distance in the bilogarithmic plane between the generic working point and Tillmann's line;
- the head loss in the microcapillary.

In particular, it has been verified that the magnitude of the distance between the working point and Tillmann's line (Figure Ia) and the head loss in the microchannel (Figure Ib) were lower of defined thresholds.



**Figure I** -  $\tau$  -  $t$  diagram with Tillmann's line and the threshold lines (a);  $\Delta P$  -  $Q_{total}$  diagram with the maximum pressure threshold

In Table I are listed the selected tests basing on the mentioned criteria:

*Table I - Selected tests for the experiments aimed to evaluate the encapsulating process*

Test number	Ht	% confinement	Q <sub>central</sub> [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Q <sub>lateral</sub> [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]
1	5%	25%	14,83	22,25
2	5%	50%	27,88	13,94
3	5%	75%	38,78	6,46
4	10%	25%	13,29	19,94
5	10%	50%	25,41	12,71
6	10%	75%	36,13	6,02

The following experiments have been made to validate the computational model with a fluid dynamic analysis inside of the channel made by using a microPIV (micro Particle Image Velocimetry) system. The experimental set-up consists of two syringe pumps, three glass syringes, connection silicon tubes and a PMMA microcapillary having an inner section of  $50 \times 50 \mu\text{m}$ . The  $\mu\text{PIV}$  system measures the velocity profiles in micrometer-sized domains, based on an optical system that allows to record pairs of images corresponding to the movement of the tracing particles in the fluid in motion. By using specific algorithms of cross - correlation, it is possible to compute from each pair of images the instantaneous velocity. The results can be optimized if the density of the tracing particles is the same of the fluid's one and if the particles are small enough to follow the flow without altering it. In the software INSIGHT 3G (IST, MN, US) have been set all the parameters required for the validation tests. The main features of the selected tests are reported in Table II:

*Table II - Selected tests to validate the computational model*

Test number	Ht	% confinement	Q <sub>central</sub> [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Q <sub>lateral</sub> [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]
Prova $\alpha$	5%	50%	10	5
Prova $\beta$	1%	25%	6	9
Prova $\gamma$	1%	50%	10	5
Prova $\delta$	1%	75%	14	2,3

The software TECPLOT allowed to extract from the analyzed data a velocity distribution made by vectors. These results have been compared with the results of the computational model, in terms of width of the confined section and of maximum velocity magnitude. The low concentration of the tracing particles has been a problem for the analysis of the data. The velocity profile was computed using Excel on the basis of the data provided by the  $\mu$ PIV and the shear stresses are computed by using the relation of Casson.

Figure II shows, related to a specific test, the comparison between the velocity profile derived from experimental data and the velocity profile derived from the computational model. Figure III shows the same comparison about shear stress. It's possible to observe the parabolic shape of the two velocity profiles, typical of a fluid in laminar motion. In the shear stress diagram, in line with the expectations, there are maximum values close to the wall and a value close to zero in the center of the microchannel.

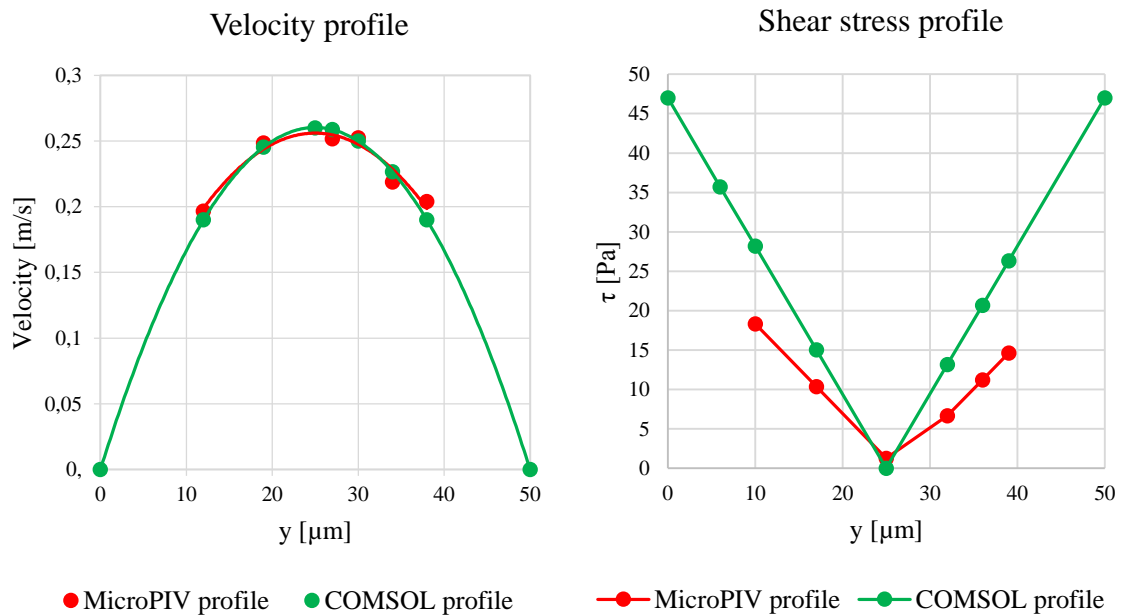


Figure II - Velocity profile of the  $\delta$  Test

Figure III - Shear stress profile of the  $\delta$  Test

Figures II and III show how the model overestimates the real values, partially for the velocity and more significantly for the shear stress. This issue is caused by the strong assumptions



made during the modeling phase. In particular, the problem is due to the approximation relative to the mechanics, to the morphology and to the rheology of the red blood cells.

In the perspective of future studies, it's very important the development of a model that takes into account the mechanical properties and the morphology of the red blood cells. It is also useful, for the future tests with the  $\mu$ PIV system using the same geometry and the technique of the confined flow, to use a red blood cells' solution with a higher concentration of polystyrene tracing particles.

# **INTRODUZIONE E OBIETTIVI**

L'utilizzo di eritrociti quali vettori di farmaci è oggetto di numerosi studi nel settore universitario e industriale. L'applicazione di stimoli fisici e/o chimici sulla superficie eritrocitaria ne causa infatti la formazione di porosità temporanee, che permettono la diffusione di generiche molecole probanti all'interno della membrana. Tali molecole rimangono intrappolate all'interno del globulo rosso al termine dell'applicazione dello stimolo, in corrispondenza della chiusura delle porosità. Il rilascio controllato di farmaco viene garantito dalla successiva emolisi, naturale o indotta. Studi recenti hanno dimostrato l'efficacia di tale processo d'incapsulamento tramite l'applicazione di sforzi di taglio agenti sulla membrana eritrocitaria in virtù dello scorrimento di fluido all'interno di canali di dimensioni micrometriche.

Questo lavoro di tesi si pone l'obiettivo di svolgere un'analisi computazionale della fluidodinamica presente a livello di capillari micrometrici con ingresso a croce, utilizzati nello specifico per l'attuazione della tecnica del flusso confinato. In seguito, saranno svolte delle prove di tenuta sul set-up sperimentale con l'obiettivo di definire la portata totale massima applicabile a livello del microcanale in modo da non indurre problemi di tenuta del circuito. Successivamente, verrà effettuata una fase di ottimizzazione dei parametri al fine di definire le ottimali condizioni di prova per prove sperimentali d'incapsulamento, in termini di sforzi di taglio, tempi di sollecitazione e, dunque, portate applicate. Infine, verrà svolta una fase di validazione del modello computazionale tramite analisi alla  $\mu$ PIV, grazie alla quale verrà osservata sperimentalmente la fluidodinamica interna al capillare.

Il presente lavoro di tesi risulta strutturato nei seguenti capitoli. Nel capitolo 1 vengono descritte le caratteristiche morfologiche, reologiche e meccaniche del sangue, fluido di lavoro utilizzato. Nel capitolo 2 vengono descritte le principali tecniche d'incapsulamento e le relative applicazioni. Nel capitolo 3 viene presentato il modello computazionale sviluppato, il modello di diffusione adottato, il protocollo di prova relativo alle prove di tenuta, il criterio di selezione delle prove d'incapsulamento e, infine, il protocollo di prova

relativo alle prove di validazione del modello computazionale. Nel capitolo 4 vengono presentati i risultati relativi al modello computazionale, i parametri relativi alle prove di lavoro selezionate per la fase d'incapsulamento, i risultati delle prove di tenuta del circuito e delle prove di validazione del modello computazionale. Nel capitolo 5 viene effettuata la discussione dei risultati ottenuti dal modello computazionale e dalle prove di validazione. Il capitolo 6, infine, riguarda le conclusioni tratte a partire dal presente lavoro di tesi e i possibili sviluppi futuri.

# 1 - IL SANGUE

## 1.1 Funzioni e composizione

Il sangue è una sospensione di elementi cellulari in una soluzione acquosa di elettroliti e altre molecole, detta plasma. Le principali funzioni svolte dal tessuto sanguigno nell'organismo sono [1]:

- trasporto di ossigeno dai polmoni ai tessuti e di anidride carbonica dai tessuti ai polmoni, mediante l'emoglobina presente nei globuli rossi;
- trasporto di sostanze nutritive alle cellule e di sostanze di scarto (cataboliti) dai tessuti ai siti di eliminazione;
- difesa dell'organismo da agenti patogeni e tossine, grazie alla presenza di proteine specifiche e di globuli bianchi;
- emostasi, svolta dalle piastrine al fine di arrestare emorragie interne o esterne;
- regolazione del pH e della concentrazione elettrolitica dei liquidi interstiziali;
- veicolazione di enzimi, ormoni, ioni e proteine;
- termoregolazione, tramite trasferimento di calore dagli organi interni verso i tessuti superficiali.

Il processo di centrifugazione permette di separare i componenti di cui il sangue è composto, ossia il plasma e la parte corpuscolata.

### 1.1.1 Plasma

Il plasma costituisce circa il 55% del volume di sangue in un organismo adulto. Presenta una densità volumetrica  $\rho$  pari a  $1030 \text{ kg/m}^3$ , valore leggermente superiore a quello dell'acqua. Esso è composto dalle seguenti sostanze (per le quali viene specificato il contenuto volumetrico percentuale):

- acqua: 92%;
- proteine (albumine, globuline, fibrinogeno e transferrine): 7%;
- lipidi, glucosio, vitamine, aminoacidi, ioni ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ),  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , ormoni e sostanze di rifiuto: 1%.

La composizione del plasma è pressoché identica a quella del liquido interstiziale, eccetto che per la presenza delle proteine plasmatiche. La proteina plasmatica principale è l'albumina, la quale costituisce circa il 60% in volume del contenuto proteico totale. Le albumine insieme ad altre proteine, quali globuline, fibrinogeno e transferrine, rappresentano più del 90% delle proteine plasmatiche. Il fegato sintetizza la maggior parte di queste proteine e le rilascia in circolo. Una classe particolare di globuline, note come immunoglobuline o anticorpi, svolge la funzione di difesa dell'organismo attaccando le proteine estranee e gli agenti patogeni. Gli anticorpi vengono sintetizzati da un particolare tipo di globuli bianchi (i linfociti B). Un'ulteriore classe di globuline è rappresentata dalle proteine vettrici, le quali agiscono da trasportatori per ormoni steroidei, colesterolo, farmaci ed alcuni ioni. La presenza di proteine del plasma (soprattutto dell'albumina) rende la pressione osmotica del sangue maggiore di quella del liquido interstiziale e in virtù di questo gradiente osmotico vi è il richiamo di acqua dal liquido interstiziale verso i capillari. Il fibrinogeno, invece, è responsabile dell'importante funzione della coagulazione del sangue.

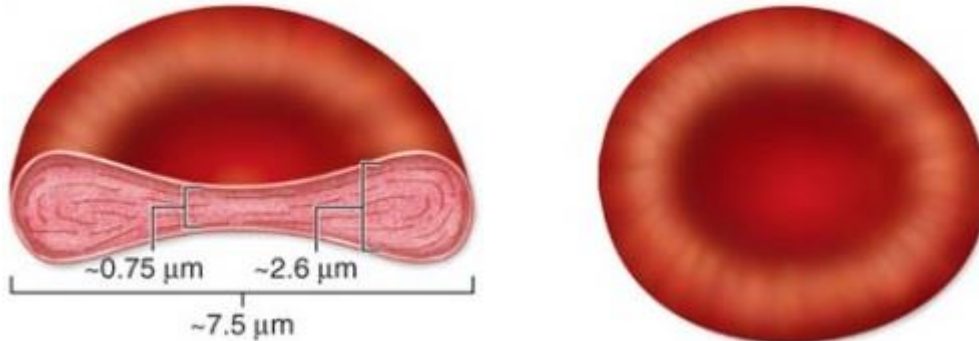
### 1.1.2 Componente corpuscolata

La parte corpuscolata costituisce circa il 45% del volume di sangue. Questa percentuale viene comunemente chiamata "ematocrito". Gli elementi di cui è composta la parte corpuscolata, e le relative percentuali, sono:

- globuli rossi (eritrociti): 95% [ $5 \cdot 10^9$  cell/mL];
- globuli bianchi (leucociti): 0,13% [ $7,4 \cdot 10^6$  cell/mL];
- piastrine (trombociti): 4,9% [ $2,8 \cdot 10^8$  cell/mL].

I globuli rossi sono cellule prive di nucleo e presentano una forma a disco biconcavo, cioè un disco con una zona centrale di depressione, sia sulla superficie superiore sia su quella

inferiore, come evidente dalla Figura 1.1. In Tabella 1.1 sono invece riportate le dimensioni medie di un singolo eritrocita.



**Figura 1.1** - Vista laterale e dall'alto di un eritrocita [2]

**Tabella 1.1** - Dimensioni medie di un globulo rosso

Diametro	8,5 $\mu\text{m}$
Spessore massimo	2,4 $\mu\text{m}$
Spessore minimo	1 $\mu\text{m}$
Superficie	163 $\mu\text{m}^2$
Volume	87 $\mu\text{m}^3$
Spessore membrana	70-100 $\text{\AA}$

I globuli rossi svolgono un ruolo fondamentale nel trasporto dell'ossigeno dai polmoni ai tessuti e dell'anidride carbonica dai tessuti ai polmoni, grazie alla presenza al loro interno di una proteina chiamata emoglobina (peso molecolare = 67000 Da). All'interno della membrana del globulo, detta stroma, sono contenuti circa 29 pg di emoglobina (Hb). Gli eritrociti, al pari degli altri elementi del sangue, vengono prodotti a livello del midollo osseo e discendono principalmente da un unico tipo di cellula precursore definita "cellula staminale emopoietica pluripotente"; la loro vita media è di circa 120 giorni.

I globuli bianchi svolgono un ruolo chiave nella difesa dell'organismo da agenti patogeni esterni come parassiti, batteri e virus. Data la presenza di un diametro cellulare pari a circa  $10 \div 15 \mu\text{m}$ , essi sono più robusti e più grandi dei globuli rossi; inoltre, a differenza di questi ultimi, i globuli bianchi sono cellule nucleate e vengono introdotti nella circolazione solo in

presenza di infezioni. Esistono tre differenti tipologie di globuli bianchi: granulociti, linfociti e monociti. In condizioni normali di salute, questi costituiscono rispettivamente il 70%, il 25% e il 5% del totale. I granulociti si dividono, a seconda del loro ruolo specifico, in neutrofili, eosinofili e basofili; hanno vita media breve, dalle 12 alle 36 ore, e vengono distrutti nel fegato e nella milza. Le caratteristiche di ciascuna sottoclasse di leucociti sono le seguenti:

- linfociti B, la cui mansione è quella di produrre anticorpi che riconoscono determinate porzioni proteiche (epitopi) attivando la risposta umorale;
- linfociti T, suddivisi a loro volta in “killer”, “repressori” e “ausiliari”; essi si occupano reciprocamente di attaccare gli agenti patogeni, regolare l’azione immunologica e stimolare l’attività dei linfociti B e dei macrofagi;
- monociti, cellule di maggiore dimensione presenti nel sangue. Una volta maturi, vengono immessi in circolo dove permangono dalle 24 alle 36 ore. In presenza di reazioni infiammatorie, migrano nei tessuti connettivi dove danno origine ai macrofagi, dando inizio così ad un’intensa attività fagocitaria, accompagnata dalla produzione di sostanze con funzioni difensive;
- neutrofili, si occupano di fagocitare microbi;
- basofili, secernono sostanze anticoagulanti o vasodilatatrici come l’istamina e la serotonina;
- eosinofili, aggrediscono i parassiti e fagocitano i complessi antigene - anticorpo.

Le piastrine sono frammenti ( $\varnothing = 2,5 \mu\text{m}$ ) di cellule giganti dette megacariociti, presenti a livello del midollo osseo, e svolgono un ruolo essenziale nel processo di coagulazione; la loro vita media è di circa 10 giorni.

## 1.2 Reologia del sangue

Il comportamento reologico del sangue può essere diversamente modellizzato a seconda delle dimensioni del condotto all’interno del quale esso scorre [3]. Considerando vasi di largo calibro, il sangue può essere considerato come un fluido omogeneo newtoniano, poiché la dimensione delle particelle presenti nella sospensione sanguigna non è confrontabile con le dimensioni del vaso in cui circolano. Per quanto riguarda invece la microfluidica, non è

possibile pensare alla medesima semplificazione, poiché le dimensioni delle particelle non sono più trascurabili rispetto alle dimensioni del vaso. Dunque, il sangue viene in questi casi considerato come un fluido non-newtoniano bifase.

### 1.2.1 Proprietà reologiche del sangue

Nel seguente paragrafo vengono descritte le proprietà reologiche principali del sangue: massa volumica e viscosità.

#### 1.2.1.1 Massa volumica

La massa volumica, o densità, del sangue è legata alla concentrazione della componente corpuscolata attraverso la seguente relazione:

$$\rho_s = (1 - Ht) \cdot \rho_p + Ht \cdot \rho_{gr} \quad (1.1)$$

dove:

$\rho_s = 1060 \text{ kg/m}^3$ , è la massa volumica del sangue per ematocrito  $Ht = 45\%$ ;

$\rho_p = 1035 \text{ kg/m}^3$ , è la massa volumica del plasma in condizioni fisiologiche;

$\rho_{gr} = 1090 \text{ kg/m}^3$ , è la massa volumica della parte corpuscolata in condizioni fisiologiche.

Fissato il valore di ematocrito, dunque, la densità è indipendente dalla pressione e dalla temperatura e assume un valore costante.

#### 1.2.1.2 Viscosità

La viscosità è una proprietà intrinseca di ogni fluido e rappresenta la resistenza allo scorrimento. Per i fluidi newtoniani essa rappresenta la costante di proporzionalità diretta tra sforzo tangenziale e velocità di deformazione:

$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad (1.2)$$

Essendo il sangue una sospensione liquida di particelle, è necessario distinguere la viscosità del plasma ( $\mu_p$ ) dalla viscosità del sangue intero ( $\mu_s$ ).



Per quanto riguarda il plasma valgono le seguenti relazioni:

$$\mu_p = 1,8 \cdot \mu_{H_2O}, \text{ per } T > 20 \text{ }^\circ\text{C} \quad (1.3)$$

$$\mu_p = \mu_{H_2O} \cdot (1,32 + 0,024 \cdot T), \text{ per } T < 20 \text{ }^\circ\text{C} \quad (1.4)$$

$$\mu_{H_2O} = \mu_0 \cdot (1 + 0,00337 \cdot T + 0,00022 \cdot T^2)^{-1} \quad (1.5)$$

dove la temperatura  $T$  è espressa in  $^\circ\text{C}$  e  $\mu_0 = 1,808 \text{ cP}$  è la viscosità dell'acqua a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Per il calcolo della viscosità del sangue intero vale invece la formula di Bull:

$$\mu_s = \mu_p \cdot (1 + 2,5 \cdot Ht) \quad (1.6)$$

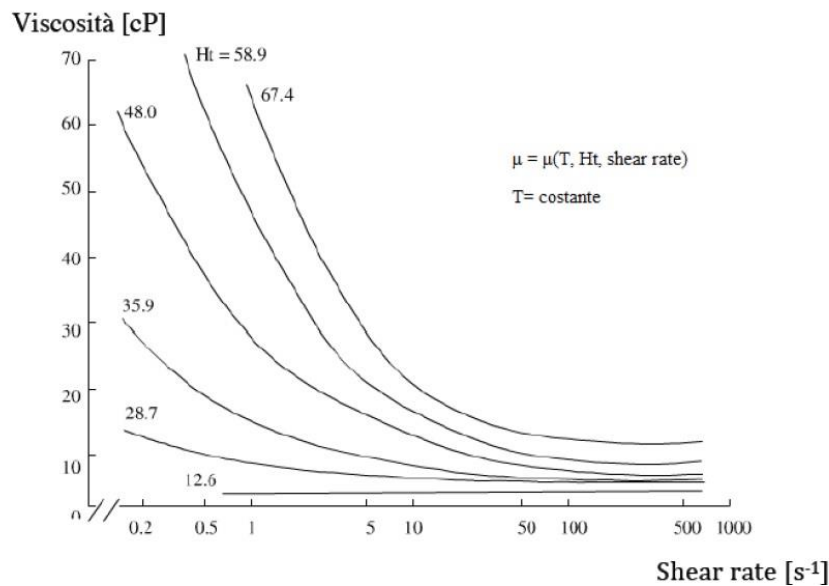
Considerando l'ematocrito fisiologico  $Ht = 45\%$  si ottiene:

$$\mu_s = 3,45 \text{ cP per } T = 20 \text{ }^\circ\text{C};$$

$$\mu_s = 2,72 \text{ cP per } T = 37 \text{ }^\circ\text{C}.$$

La formula di Bull permette di considerare solo i casi in cui il sangue può essere trattato come un fluido newtoniano, laddove dunque la viscosità è una proprietà termofisica del fluido dipendente dalla sola temperatura. La formula, dunque, non evidenzia il comportamento non newtoniano del sangue nella microcircolazione, condizione in cui a basso *shear rate* aumenta  $\mu$ , a causa della formazione di *rouleaux*.

In Figura 1.2 è mostrata la dipendenza della viscosità del sangue dalla velocità di deformazione: all'aumentare di  $\dot{\gamma}$  la viscosità diminuisce.



**Figura 1.2** - Andamento della viscosità del sangue in funzione dello shear rate al variare dell'ematocrito [4]

A basso gradiente di velocità è possibile descrivere il comportamento non newtoniano del sangue attraverso il modello di Casson:

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_y} + s \cdot \sqrt{\dot{\gamma}} \quad (1.7)$$

dove  $\tau$  è lo sforzo tangenziale,  $s$  una costante e  $\tau_y$  rappresenta, invece, il valore di soglia dello sforzo di taglio (*yield stress*), vale a dire il valore necessario a far sì che abbia inizio lo scorrimento del fluido e al di sotto del quale il sangue mostra un comportamento di tipo solido elastico. La costante  $s$  dipende, invece, dall'ematocrito e dalla viscosità del plasma. Le equazioni per il calcolo di  $\tau_y$  e  $s$  sono le seguenti:

$$\tau_y = (Ht - 0,017) \cdot (1,55 \cdot C_f + 0,76)^2 \quad (1.8)$$

$$s = \left[ \frac{\mu_p}{(1-Ht)^{2k}} \right]^{1/2} \quad (1.9)$$

dove  $C_f$  rappresenta la concentrazione di fibrinogeno nel plasma [g/dL] e  $k$  è una costante, funzione della concentrazione delle altre proteine del plasma.

Come è possibile osservare dal grafico di Figura 1.3, per bassi valori di ematocrito ( $Ht < 0,085$ ) il comportamento del sangue può essere descritto come quello di un fluido newtoniano. All'aumentare del valore di ematocrito, si distinguono due zone: la prima, per bassi valori di *shear rate*, caratterizzata da un comportamento non lineare e la seconda, per

valori maggiori di *shear rate*, caratterizzata da un comportamento lineare. Si osserva inoltre come all'aumentare dell'*Ht* aumenta anche l'estensione della zona non lineare.

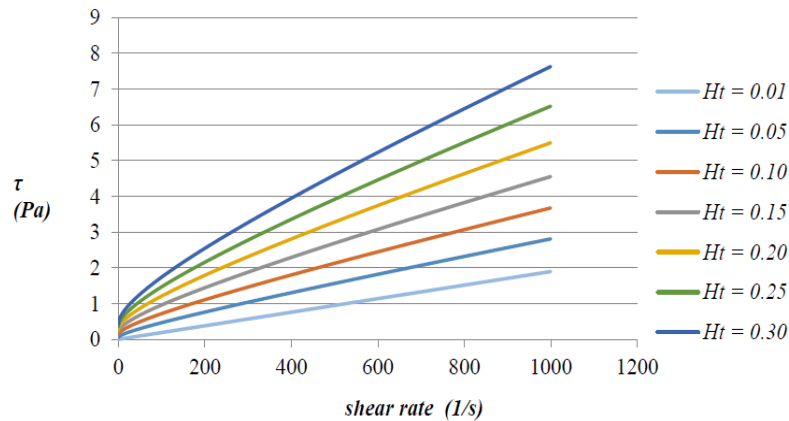


Figura 1.3 - Diagramma di Casson [4]

## 1.2.2 Microcircolazione

Si parla di microcircolazione quando il diametro degli eritrociti è comparabile a quello dei condotti in cui essi scorrono ( $< 100 \mu\text{m}$ ). In tale condizione non è possibile modellizzare il sangue come un fluido omogeneo, per cui si ricorre alla trattazione adottata per i fluidi bifase: si distingue una fase liquida portante, il plasma, e una fase solida e deformabile costituita da elementi figurati.

Poiché nella microcircolazione il sangue perde il suo comportamento newtoniano, si definisce viscosità apparente ( $\mu_{app}$ ) la viscosità del sangue supponendo che esso possa essere trattato come un fluido omogeneo newtoniano. Considerando un moto laminare in un condotto cilindrico, con pareti rigide e in regime stazionario, vale la legge di Poiseuille, da cui deriva la definizione di  $\mu_{app}$ :

$$\Delta P = \frac{128\mu L}{\pi D^4} \cdot Q \rightarrow \mu_{app} = \frac{\pi D^4 \cdot \Delta P}{128QL} \quad (1.10)$$

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

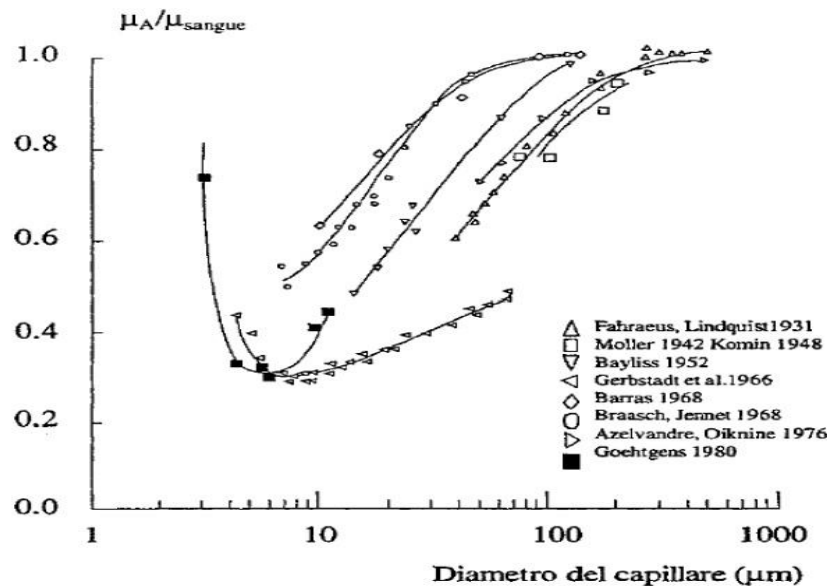
Si definisce invece “viscosità relativa”:

$$\mu_R = \frac{\mu_{app}}{\mu_0} \quad (1.11)$$

dove  $\mu_0$  rappresenta la viscosità dell’acqua a 0 °C.

### 1.2.2.1 Effetto Fahraeus - Lindqvist

Nella microcircolazione, per diametri inferiori a 100  $\mu\text{m}$ , ad una diminuzione del diametro del condotto è associata una riduzione della viscosità apparente (Figura 1.4).



**Figura 1.4** - Andamento della viscosità apparente in funzione del diametro del condotto [4]

La disposizione degli eritrociti sull’asse del condotto e la distribuzione del plasma in prossimità delle pareti fa sì che la viscosità apparente diventi minore della viscosità del sangue. Ogni globulo è sottoposto a campi di velocità diversi alle due estremità (a parità di portata, se diminuisce il diametro del condotto, aumentano le velocità e lo *shear rate*). Ciò porta la cellula a porsi con l’asse maggiore nella direzione del flusso e a spostarsi verso il centro del capillare. Il plasma forma un meato che funge da lubrificante per lo scorrimento delle cellule, riducendo l’attrito. Lo spessore di questo strato dipende dal valore di

ematocrito, dal diametro del condotto e dal regime di moto: esso infatti diminuisce all'aumentare dell'ematocrito e al diminuire del diametro.

La viscosità apparente raggiunge il minimo per valori di diametro compresi tra i 5 e i 7  $\mu\text{m}$ , corrispondenti al diametro dei capillari sanguigni. Per diametri inferiori, la viscosità apparente aumenta: gli eritrociti hanno dimensioni superiori rispetto alla sezione del condotto, dunque la resistenza opposta è elevata e sono necessari elevati gradienti pressori per deformare il globulo e garantire la continuità del flusso [5-8].

### 1.2.2.2 Effetto Fahraeus

Fissato un certo valore di ematocrito, facendo fluire il sangue da una riserva di monte ad una riserva di valle attraverso un capillare, si osservano i seguenti fenomeni [5-8]:

- 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. 1.5);
- 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  $\mu\text{m}$ , il valore di ematocrito nel capillare è minore di quello nella riserva a valle (Fig. 1.6).

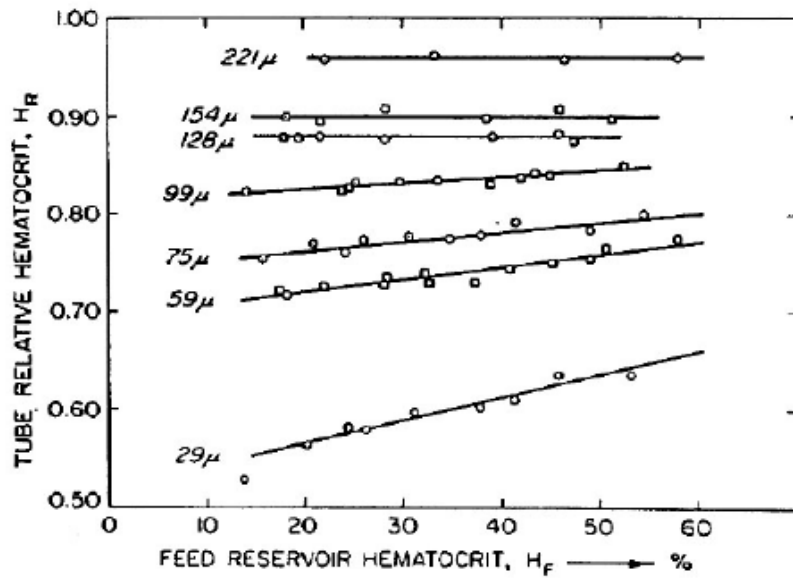


Figura 1.5 - Andamento dell'ematocrito relativo  $H_R = H_T/H_D$  in funzione dell'ematocrito nella riserva a monte ( $H_F$ ) al variare del diametro del capillare [4]

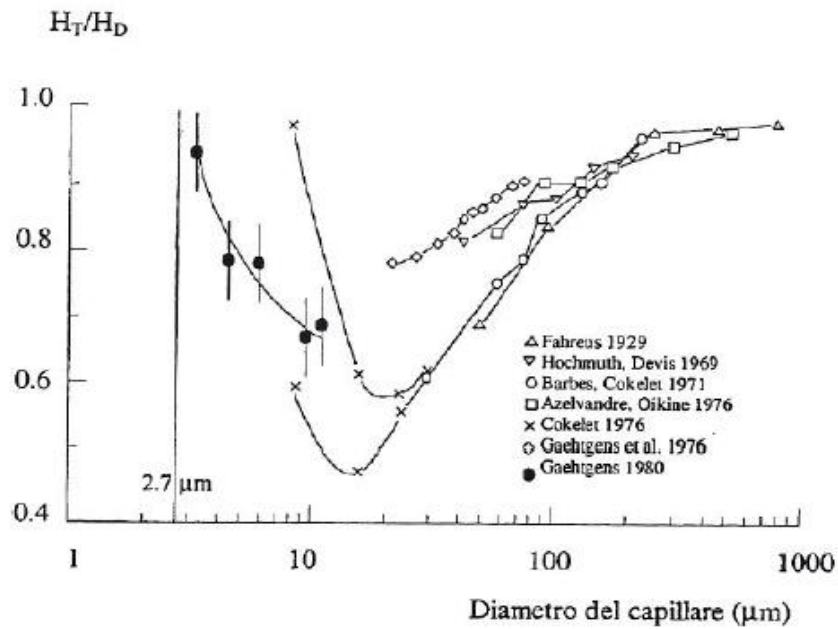


Figura 1.6 - Andamento del rapporto  $H_T/H_D$  (asse delle ascisse logaritmico) al variare del diametro del condotto, per diverse prove sperimentali e con  $H_F$  fissato pari a 40% [4]

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 il volume dei globuli rossi e il volume di sangue nel suo complesso.

$$H_T = \frac{\int_0^R H(r)\pi r dr}{V} \quad H_D = \frac{\int_0^R H(r)v(r)\pi r dr}{V} \quad (1.12)$$

### 1.2.2.3 *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  $\delta$  e viscosità  $\mu_p$ , mentre nella restante parte di capillare scorre sangue con viscosità  $\mu_s$ . Nell'ipotesi di flusso alla Poiseuille, le velocità di plasma ( $v_p$ ) e sangue ( $v_s$ ) sono date dalle seguenti relazioni:

$$v_s = -\frac{1}{4} \frac{\Delta p}{L} \left( \frac{r^2 - (R-\delta)^2}{\mu_s} + \frac{(R-\delta)^2 - R^2}{\mu_p} \right) \quad 0 < r < R - \delta \quad (1.13)$$

$$v_p = -\frac{1}{4\mu_p} \frac{\Delta p}{L} (r^2 - R^2) \quad R - \delta < r < R \quad (1.14)$$

La viscosità apparente è definita, invece, come:

$$\mu_{app} = \mu_p \left[ 1 - \left( 1 - \frac{\delta}{R} \right)^4 \cdot \left( 1 - \frac{\mu_p}{\mu_s} \right) \right]^{-1} \quad (1.15)$$

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  $\delta/R$ , 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  $\delta$  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 movimento dei globuli rossi nel capillare [9].

### 1.3 Emolisi

Si definisce emolisi il processo di rottura della membrana eritrocitaria, con conseguente fuoriuscita dell'emoglobina contenuta nel globulo rosso [10]. L'emolisi fisiologica avviene continuamente nell'organismo sano, per opera del sistema reticolo - endoteliale e di altri organi, quali fegato e milza, e coinvolge eritrociti al termine della loro vita (120 giorni). Un comportamento non fisiologico del processo emolitico potrebbe portare l'organismo a delle difficoltà nel mantenimento dei processi emostatici. L'emolisi favorisce ed accelera la coagulazione e la trombogenesi. Inoltre, se l'emolisi è massiva e prolungata, può portare alla saturazione della capacità del rene di filtrare emoglobina. L'entità dell'emolisi indotta può essere valutata misurando la quantità di emoglobina libera presente nel sangue.

#### 1.3.1 Emolisi non fisiologica

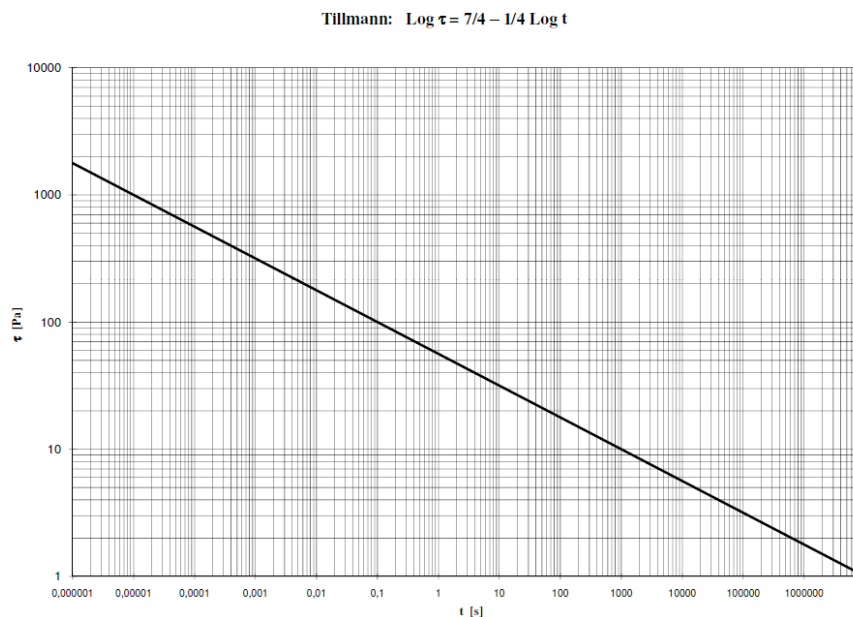
Le cause di emolisi non fisiologica possono essere di natura termica, pressoria, osmotica, chimica o meccanica. È stato ad esempio dimostrato che temperature maggiori di 43 °C e variazioni molto rapide di temperatura provocano la rottura dello stroma. Pressioni positive, che determinano quindi una compressione dell'eritrocita, non provocano danni anche se elevate; al contrario, pressioni negative, di trazione, sono emolitiche per valori in modulo maggiori di 120 mmHg. I globuli rossi immersi in soluzioni ipotoniche aumentano il loro volume a causa dell'ingresso d'acqua; essi tendono così a diventare sferici e la membrana



tende a rompersi. L'emolisi può essere causata anche dalla presenza di sostanze chimiche, come ad esempio alcuni sali biliari, tossine di alcuni batteri, veleni di serpenti e insetti. Altre sostanze, come alcuni antibiotici e il glucosio possono essere, invece, protettive per gli eritrociti.

### 1.3.2 Emolisi meccanica

Il fenomeno dell'emolisi meccanica consiste nella rottura della membrana per effetto di sollecitazioni meccaniche. I fattori più rilevanti che inducono emolisi sono lo sforzo di taglio e il tempo di applicazione; una minore influenza è svolta dal regime di moto del fluido (turbolento o laminare). I più importanti studi a questo proposito sono stati eseguiti da Tillmann, il quale riunì in un unico diagramma i risultati raccolti dagli studi di altri ricercatori sull'emoliticità. Si tratta di un diagramma bilogarithmico (Figura 1.7), con in ordinata i valori degli sforzi di taglio e in ascissa i valori dei tempi di sollecitazione.



**Figura 1.7** - Diagramma di Tillmann [10]

Il piano  $\tau - t$  è diviso in due regioni da una curva limite, ottenuta riportando in diagramma le coppie di valori di sforzi di taglio e la durata della sollecitazione per cui si è riscontrata la rottura degli eritrociti. La zona al di sotto della curva viene definita “zona sub - emolitica”, mentre la zona superiore viene definita “zona emolitica”. La curva limite di Tillmann, nel piano bilogarithmico, ha la seguente formula:

$$\log \tau = \frac{7}{4} - \frac{1}{4} \log t \quad (1.16)$$

Questa curva limite rappresenta un'indicazione statistica, di conseguenza permette di avere una stima del danno emolitico subito dai globuli rossi. I punti al di sopra della curva sono caratterizzati da danno emolitico, i punti in prossimità della curva sono caratterizzati dal fenomeno di apertura dei pori di membrana e i punti al di sotto della curva, pur ritrovandosi nella zona non emolitica, sono potenzialmente soggetti al fenomeno del danno sub-emolitico, come in seguito approfondito nel Paragrafo 1.4.

### 1.3.3 Meccanismi di emolisi meccanica in un tubo

Il moto in un condotto implica sollecitazioni meccaniche di varia natura. Vi sono sollecitazioni di taglio dovute alle interazioni con le pareti del condotto e tra i diversi filetti fluidi, sollecitazioni meccaniche di imbocco e sbocco e urti tra i globuli rossi. All'interno dei capillari sanguigni, in particolari condizioni, si può verificare un processo a cascata costituito da due meccanismi emolitici: a livello della parete gli eritrociti subiscono un primo e più significativo danneggiamento e, in secondo luogo nel fluido, il danneggiamento si completa.

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

A livello di parete l'emolisi è causata dall'interazione delle cellule con essa. L'entità di questo fenomeno 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 una funzione protettiva sulle cellule.

In presenza di condotti lunghi e stretti, il danneggiamento dei globuli rossi risulta essere principalmente dovuto agli sforzi di taglio causati dallo scorrimento del fluido. Per altri tipi di condotti (corti e tozzi), le principali fonti di danneggiamento sono focalizzate a livello dell'imbocco (brusco restringimento) e a livello dello sbocco (brusco allargamento).

### 1.3.4 Invecchiamento cellulare

L'invecchiamento cellulare è uno dei principali fattori responsabili della diminuzione della deformabilità e dell'aumento di densità dei globuli rossi. Con l'invecchiamento gli eritrociti espellono elettroliti e acqua, portando dunque a una conseguente riduzione dell'area e del volume (MCV, *Mean Corpuscular Volume*) e a un aumento della concentrazione di emoglobina (MCHC, *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*). Quest'effetto consente di separare popolazioni cellulari di età diverse, mediante centrifugazione.

Un generico volume di sangue, costituito da popolazioni cellulari di età diversa, presenta un'emolicità derivante dall'insieme dei diversi comportamenti; i primi effetti emolitici, infatti, si manifestano sulle popolazioni di globuli rossi più anziane. E' inoltre importante tenere conto del fatto che gli eritrociti, in esperimenti condotti *in vitro*, perdono di deformabilità in maniera dipendente non solo dall'invecchiamento ma anche dai metodi e dalla durata della loro conservazione [5-8].

## 1.4 Danno sub - emolitico

Per danno sub - emolitico si intende un danneggiamento meccanico dei globuli rossi che si verifica in modo o in misura tale da non causarne la rottura, ma l'alterazione delle componenti, del contenuto o della membrana [11].

Vengono riportate di seguito le principali proprietà utilizzate come indice del danneggiamento sub - emolitico dovuto allo sforzo di taglio:

- tasso di sopravvivenza degli eritrociti dopo la sollecitazione: viene valutato come il tempo di emivita delle cellule sottoposte a sollecitazione meccanica rispetto a quello delle cellule 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 a intrappolamento nella milza per essere poi distrutti;
- 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. Quanto maggiore è la durata della sollecitazione, tanto più

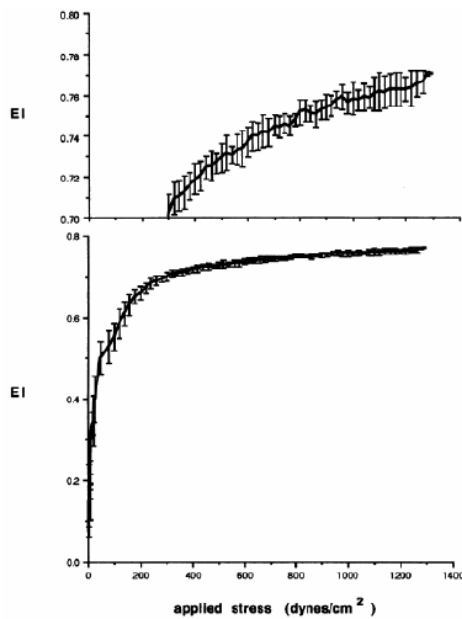
elevata sarà la sensibilità all'emolisi osmotica. Il fenomeno si presenta anche in soluzioni prossime all'isotonicità [12];

- attività dell'enzima acetilcolinesterasi di membrana: all'aumentare della durata della sollecitazione, si può osservare una diminuzione dell'attività di questo enzima. Essendo un costituente dello stroma, questa riduzione potrebbe indicare una perdita di parte della membrana. E' interessante notare come tale riduzione accompagni il normale invecchiamento della cellula [11];
- permeabilità di membrana agli ioni sodio ( $\text{Na}^+$ ) e potassio ( $\text{K}^+$ ), all'emoglobina e all'ATP: in un dispositivo cono-piatto per un periodo di sollecitazione di un'ora è stato osservato un incremento della permeabilità al  $\text{Na}^+$  e quindi del contenuto di  $\text{Na}^+$  all'interno della cellula in eritrociti sottoposti a sforzi di 10 Pa. Tale fenomeno è stato osservato anche con una sollecitazione di 50 Pa in un viscosimetro alla Couette per un periodo di 3 o 4 ore. Dato che la membrana è permeabile all'acqua, cellule che incrementano la loro concentrazione interna di  $\text{Na}^+$  dovrebbero essere più sensibili ad emolisi per osmosi. Evidenze sperimentali indicano (in presenza di una sufficiente quantità di ATP) un incremento dell'attività della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  a seguito dell'incremento della concentrazione di  $\text{Na}^+$ . Ciò dimostra 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.

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, valutando l'ellitticità come segue:

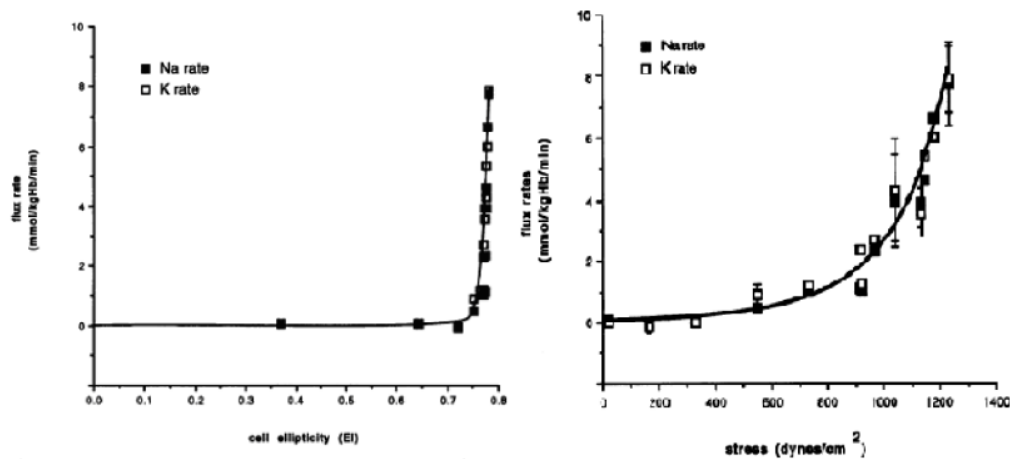
$$EI = \frac{(L-W)}{(L+W)} \quad (1.17)$$

dove L rappresenta la lunghezza dell'asse maggiore e W la lunghezza dell'asse minore in configurazione *tank treading* (configurazione ellissoidale causata dallo *shear rate*, in cui la membrana ruota attorno al citoplasma, determinando una riduzione della resistenza viscosa all'avanzamento) [13]. 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 ellitticità, ma solo per incrementi notevoli dello sforzo di taglio (Figura 1.8).



*Figura 1.8 - Misura dell'ellitticità dell'eritrocita in funzione dello sforzo di taglio applicato [4]*

Il grafico di Figura 1.9 rappresenta la permeabilità di membrana al sodio e al potassio in funzione dell'ellitticità e dello sforzo di taglio. Si osserva come il flusso di ioni attraverso la membrana, e di conseguenza le variazioni della permeabilità, non siano misurabili sino ad elongazioni del 96%; incrementando, invece, l'elongazione, e quindi lo sforzo applicato, si ha un rapido aumento del flusso di ioni per valori di EI da 0,77 a 0,78.



*Figura 1.9 - 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 4 dati; per gli altri dati è stato impostato uno shear rate di  $1500 \text{ s}^{-1}$ , e variata la viscosità [4]*

Per spiegare l'effetto dell'incremento di permeabilità di membrana con lo sforzo di taglio, si ipotizza che, in conseguenza dello stiramento della membrana, si abbia una graduale apertura

dei pori. Blackshear ipotizzò una dimensione dei pori di  $10 \div 20 \text{ \AA}$ , che dovrebbe permettere il passaggio di sodio e potassio e di molecole più grandi, come ATP e 2-3DPG, ma non dell'emoglobina ( $31 \text{ \AA}$ ). Chien et Al. avanzò l'ipotesi che questi pori potessero raggiungere i  $100 \text{ \AA}$ , ma che non rimanessero aperti per un tempo sufficientemente prolungato da poter apprezzare la diffusione dell'emoglobina.

## 1.5 Stroma

La membrana del globulo rosso costituisce l'1% del peso a secco dell'eritrocita. Le funzioni della membrana sono: delimitazione della cellula, determinazione della forma biconcava, capacità di attraversare capillari di dimensioni inferiori al diametro del globulo rosso grazie alla superficie deformabile e resiliente (disposizione a forma di paracadute), regolazione del contenuto cellulare, mantenimento di un gradiente ionico tra interno e esterno e regolazione delle interazioni con le cellule e il mezzo circostanti. Lo stroma è costituito per il 48% da proteine, per il 44% da lipidi e per l'8% da carboidrati (glicoproteine o glicolipidi). La membrana dell'eritrocita delimita al suo interno il citoscheletro. Da un punto di vista meccanico, la resistenza all'estensione è attribuita al doppio strato lipidico della membrana mentre la resistenza al taglio è attribuita al citoscheletro.

### 1.5.1 Membrana plasmatica

La membrana plasmatica presenta una struttura detta "a mosaico fluido" (Figura 1.10), in cui è presente un doppio strato di molecole fosfolipidiche. Tali molecole sono disposte in modo che gruppi non polari idrofobi siano a diretto contatto tra loro e gruppi polari idrofili siano invece rivolti verso l'esterno, formando la superficie interna e esterna dello stroma. All'interno del doppio strato è inserito il colesterolo. La matrice fosfolipidica ha importanti proprietà:

- asimmetria: lo strato esterno è composto principalmente da colinefosfolipidi mentre lo strato interno da aminofosfolipidi;
- dinamicità: le molecole fosfolipidiche traslano lateralmente con una velocità di circa  $1 \mu\text{m/s}$  mentre, invece, lo scambio di molecole tra strato interno e esterno (fenomeno del "flip - flop") è molto lento o addirittura inesistente;

- fluidità: resistenza che una certa particella incontrerebbe se fosse in grado di muoversi liberamente nella membrana, determinata dalla quantità e dal tipo di lipidi e di acidi grassi e dalla temperatura del sistema.

La superficie della membrana e la morfologia cellulare dipendono dal quantitativo di colesterolo presente nella membrana e dal rapporto molare tra colesterolo e fosfolipidi. Il trasporto di sostanze (ioni, piccole molecole organiche, acqua, ossigeno, anidride carbonica, ormoni e proteine) attraverso la membrana può avvenire secondo tre meccanismi:

- diffusione semplice (o trasporto passivo): è regolata dalla legge di Fick, secondo la quale un soluto in soluzione tende a migrare verso zone a minore concentrazione:

$$J = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} ; \quad (1.18)$$

- trasporto attivo: meccanismo mediante il quale il globulo mantiene una differenza di concentrazione per uno specifico soluto tramite un certo dispendio energetico (meccanismo della pompa ionica);
- diffusione facilitata (o trasporto passivo mediato): avviene mediante l'intervento di molecole trasportatrici secondo gradiente di concentrazione.

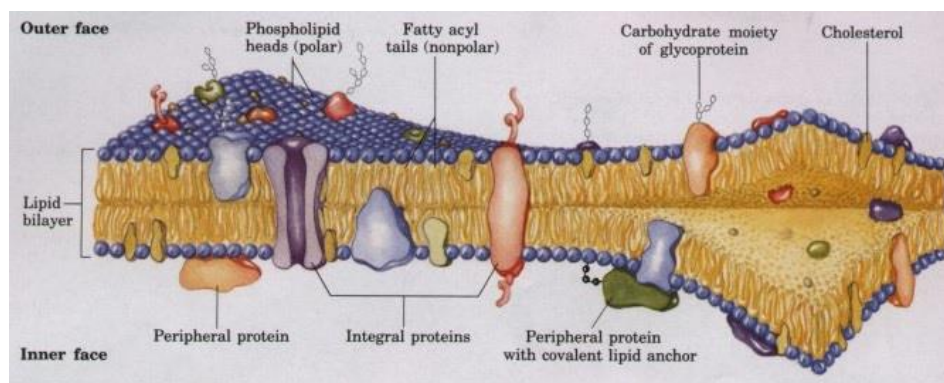


Figura 1.10 - Struttura della membrana di un eritrocita [2]

### 1.5.2 Citoscheletro

Il citoscheletro è composto da tetrameri di spectrina, connessi al doppio strato di fosfolipidi, e da altri elementi proteici in diverse configurazioni e funzioni. Esistono proteine transmembrana che svolgono funzioni catalitiche, ad esempio il canale di trasporto per gli anioni (banda 3), la pompa sodio - potassio e il canale di trasporto per il glucosio. Altre proteine di membrana svolgono la funzione di recettori, quali le glicoproteine o gli antigeni per il gruppo sanguigno. Svolgono invece una funzione di sostegno e di stabilizzazione della membrana le proteine strutturali, ovvero la spectrina (banda 1 e 2) e l'actina (banda 5). L'anchirina (banda 2.1) ha la funzione di connettere il citoscheletro alla membrana.

### 1.5.3 Trasformazioni morfologiche

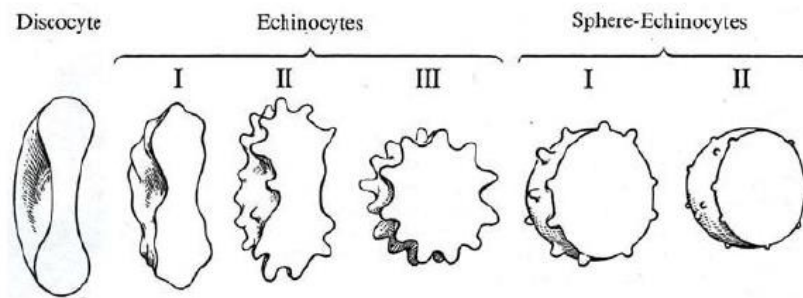
Gli eritrociti possono subire trasformazioni morfologiche isovolumetriche in seguito a trattamenti farmacologici o spontaneamente in vitro [5]. È possibile distinguere due diverse conformazioni oltre a quella fisiologica: la conformazione stomatocitica e quella echinocitica.

La configurazione echinocitica è caratterizzata dalla presenza di protrusioni corte e uniformemente distribuite, in numero e dimensioni dipendenti dal livello di trasformazione. Secondo la classificazione di Bess [14] si distinguono quattro diverse morfologie (Figura 1.11):

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

I globuli rossi in forma echinocitica presentano un aumento dell'area superficiale e una minore deformabilità dello stroma. La presenza delle spicole provoca una maggiore interazione tra le cellule e, dunque, un aumento della viscosità del sangue. Tale aumento è più significativo per bassi valori di *shear rate* ( $0,1 \div 1,0 \text{ s}^{-1}$ ), mentre per alti valori la superficie dell'echinocita viene parzialmente levigata per opera delle forze di taglio.





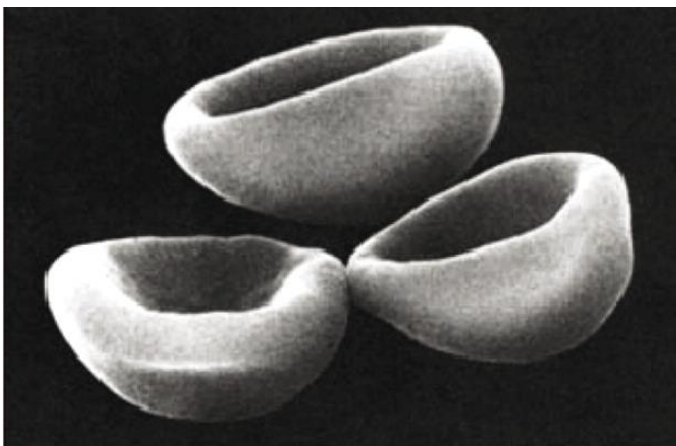
**Figura 1.11** - Degenerazione della morfologia degli eritrociti [14]

La configurazione stomatocitica presenta un aumento della sfericità e un'unica concavità con eritrociti di grandezza variabile a seconda del livello di trasformazione.

Si distinguono quattro diverse morfologie:

- stomatociti di tipo I (Figura 1.12): globulo a forma di cappello (RBC convesso concavo);
- stomatociti di tipo II: globulo con una pronunciata concavità;
- stomatociti di tipo III: globulo con una profonda concavità e una distorsione della membrana e/o piccole indentazioni della stessa;
- sferostomatociti: globulo sferico con un'area irregolare caratterizzata dalla presenza di piccole cavità.

I globuli rossi in forma stomatocitica presentano una ridotta deformabilità e, dunque, una maggiore difficoltà ad attraversare piccoli vasi. Essi vengono rapidamente rimossi dalla circolazione per opera della milza.



**Figura 1.12** - Stomatocita di tipo I [15]

### 1.5.4 Proprietà meccaniche dello stroma

Il globulo rosso può essere modellato, da un punto di vista meccanico, come una sottile membrana che racchiude un liquido viscoso newtoniano. Lo stroma presenta una bassa resistenza a elongazioni uniassiali e a deformazioni che ne modificano la forma, ma oppone un'elevata resistenza a variazioni di densità superficiale e di area. La membrana è incomprimibile in direzione assiale alla superficie, mentre è trascurabile la variazione di spessore nelle altre direzioni. La resistenza all'espansione è dovuta al doppio strato fosfolipidico, mentre la resistenza al taglio è attribuita al citoscheletro.

La membrana ha un comportamento sia viscoelastico sia viscoplastico [3-6]. 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 (con area e spessori costanti) tornando poi alla configurazione indeformata dopo un certo intervallo di tempo (comportamento viscoelastico). In risposta a sollecitazioni più prolungate, la membrana può invece subire nel tempo deformazioni irreversibili (comportamento viscoplastico): deformazione per *creep* a bassi valori di forza applicata per lunghi intervalli di tempo (5 ÷ 10 min) e deformazione plastica permanente per alti valori di forza applicata ( $> 10^{-11}$  N).

Esistono tuttavia dei limiti nella flessibilità della membrana: gli eritrociti, nelle diverse condizioni di stress a cui sono sottoposti, presentano una relativa fragilità che porta alla lisi.

Per poter definire il valore di sforzo a rottura dello stroma, si ricorre all'approccio sperimentale proposto da Rand nel 1964 [16-17]. Tale approccio si focalizza principalmente sulle caratteristiche meccaniche della membrana piuttosto che sulla resistenza a trazione della stessa.

Tramite una pipetta in vetro del diametro di pochi micrometri, è possibile risucchiare parzialmente un globulo rosso tramite la creazione di una depressione all'interno dello strumento, come schematizzato in Figura 1.13. La deformabilità della membrana consente il raggiungimento di una situazione limite ideale che permette 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.

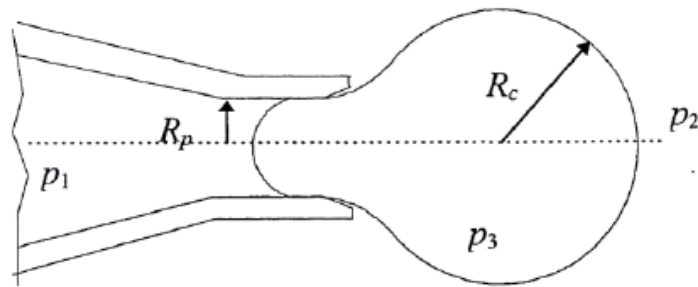


Figura 1.13 - Esperimento di Rand [16]

Supponendo che il globulo rosso sia sottoposto ad una sollecitazione di trazione uniforme da una tensione  $s$  sulla superficie, si ottengono le seguenti equazioni:

$$p_3 - p_2 = \frac{2s}{R_c} \quad (1.19)$$

$$p_3 - p_1 = \frac{2s}{R_p} \quad (1.20)$$

Tali equazioni sono state ricavate applicando la legge di Laplace alle due interfacce semisferiche:

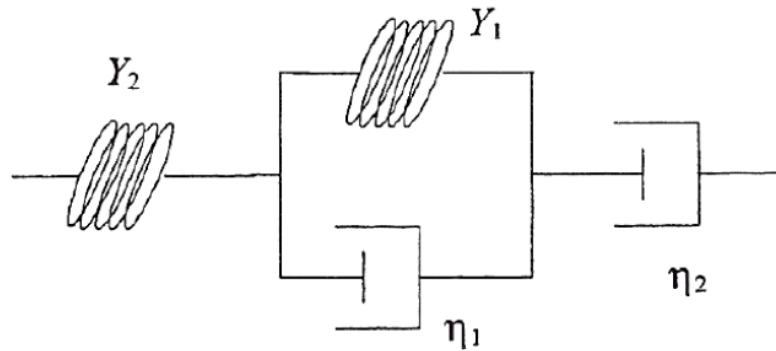
$$P = s \cdot \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (1.21)$$

Risolviendo il sistema esplicitando  $p_3$ , e assumendo  $R_1 = R_2 = R_p$  raggio di curvatura della pipetta e  $R_1' = R_2' = R_c$  raggio di curvatura dell'eritrocita, si ottiene:

$$s = \frac{p_2 - p_1}{2 \cdot \left( \frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_c} \right)} \quad (1.22)$$

Si osserva che per ricavare la tensione superficiale  $s$  è sufficiente conoscere le pressioni e la geometria della cellula. A seguito delle ipotesi fatte in precedenza e poiché viene trascurata la complessità dello stato di sollecitazione a 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 (Figura 1.14).



**Figura 1.14** - Modello viscoelastico per lo studio del comportamento della membrana del globulo rosso [16]

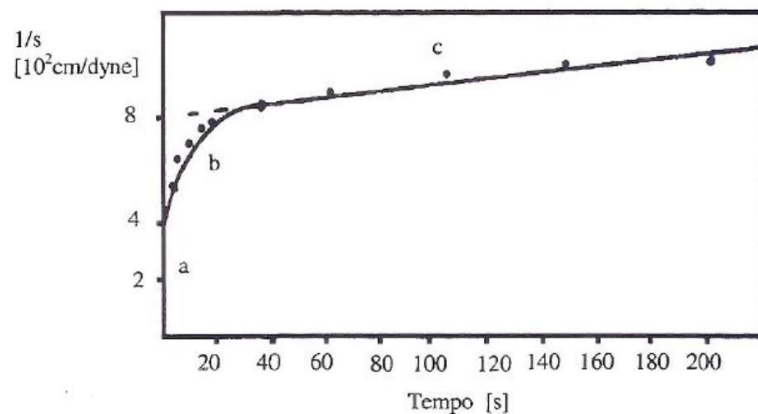
Il modello non rappresenta propriamente la membrana (per sua natura bidimensionale), ma il legame tra la sollecitazione  $s$  e la deformazione  $\delta$ :

$$\delta = s \cdot \left\{ \frac{1}{Y_2} + \frac{1}{Y_1} \cdot \left[ 1 - e^{\left( -\frac{Y_1}{\eta_1} t \right)} \right] + \frac{1}{\eta_2} \cdot t \right\} \quad (1.23)$$

dove  $Y$  e  $\eta$  sono rispettivamente il modulo elastico e la viscosità.

I risultati sperimentali suggeriscono l'ipotesi che la rottura avvenga a una deformazione critica  $\delta_c$ :

$$\frac{1}{s} = \frac{1}{\delta_c} \cdot \left\{ \frac{1}{Y_2} + \frac{1}{Y_1} \cdot \left[ 1 - e^{\left( -\frac{Y_1}{\eta_1} t \right)} \right] + \frac{1}{\eta_2} \cdot t \right\} \quad (1.24)$$



**Figura 1.15** - Diagramma di Rand per la membrana di un globulo rosso [16]

La curva in Figura 1.15 mostra tre fasi distinte:

- a) deformazione della molla  $Y_2$ ;
- b) equilibrio dinamico tra lo smorzatore  $\eta_1$  e la molla  $Y_1$ , il quale tende a caricare in un determinato periodo la molla;
- c) scorrimento continuo determinato dallo smorzatore  $\eta_2$ .

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 ( $10^9 \text{ dyne/cm}^2$ ).

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

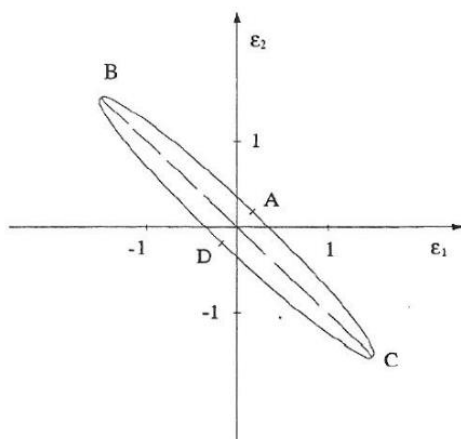
$$\frac{(\varepsilon_1 + \varepsilon_2)^2}{2 \cdot a^2} + \frac{(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)^2}{2 \cdot b^2} = 1 \quad (1.25)$$

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

$$e = \frac{L - L_0}{L_0} \quad (1.26)$$

$$\varepsilon = \ln(1 + e) \quad (1.27)$$

L'equazione di ellisse sopra riportata è rappresentabile nel piano  $\varepsilon_1 - \varepsilon_2$  (Figura 1.16) imponendo condizioni note sperimentalmente.



**Figura 1.16** - Ellisse per la determinazione della rottura della membrana del globulo rosso [4]

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

$$\frac{A-A_0}{A_0} = \varepsilon^{(e_1+e_2)} - 1 = (1 + \varepsilon_1)(1 + \varepsilon_2) - 1 \quad (1.28)$$

In accordo con Rand si pone al punto A la rottura per tensione uniforme per  $e_1 = e_2 = 0,082$  e  $\varepsilon_1 = \varepsilon_2 = 0,00786$ .

Infatti Rand trovò che l'area della membrana dell'eritrocita cresceva in media da 146 a 172  $\mu\text{m}^2$ . Altri test hanno suggerito i valori per i punti B, C e D. È difficile comprendere a fondo il meccanismo di rottura in D, il quale potrebbe essere dovuto a pieghe in compressione.

## 1.6 Conservazione del sangue

Affinché sia possibile la conservazione del sangue, è necessario l'utilizzo di adeguate sostanze anticoagulanti e conservanti da aggiungere in soluzione in rapporto predefinito [18]. A partire dal sangue intero fresco prelevato da donatore si ottiene per centrifugazione il concentrato eritrocitario, al quale viene additivata una soluzione anticoagulante - conservante; la soluzione così ottenuta viene conservata in apposite sacche. Dopo 24 ore di conservazione, diventa, essenzialmente, una sospensione di globuli rossi con un ematocrito minimo del 23% circa.

### 1.6.1 Procedura di ottenimento dei concentrati eritrocitari

I concentrati eritrocitari sono unità di sangue intero, dalle quali è stata rimossa la maggior parte del plasma. Essi si ottengono rimuovendo il plasma sovranatante dopo centrifugazione di unità di sangue intero. La quantità di plasma rimosso determina l'ematocrito dell'emocomponente. Il metodo di preparazione dei concentrati utilizzato come standard nelle strutture ospedaliere prevede la centrifugazione a 4 °C della sacca di sangue intero ad alta velocità (5000 giri/min), seguita dall'estrazione di plasma in quantità specifica a seconda dell'ematocrito che si desidera ottenere.

I concentrati eritrocitari, se preparati da sangue intero raccolto in sacche contenenti citrato fosfato destrosio (CPD), hanno un ematocrito pari all'80%. I sistemi di conservazione degli eritrociti con soluzioni additive consistono in una sacca di raccolta primaria contenente un

anticoagulante - conservante con almeno due sacche satelliti connesse ad essi: una di esse è vuota e una contiene una soluzione additiva. Le soluzioni additive contengono cloruro di sodio, destrosio, adenina e altre sostanze che consentono la sopravvivenza e la funzione dei globuli rossi sino a 42 giorni. Il volume della soluzione additiva, in un set di raccolta da 450 mL, è di 100 mL, mentre in un set di raccolta di 500 mL è di 110 mL. Tale soluzione additiva viene aggiunta agli eritrociti che restano nella sacca primaria, dopo che la maggior parte del plasma è stato rimosso. Le soluzioni additive devono essere aggiunte entro l'intervallo di tempo indicato dal produttore, generalmente entro le prime 72 ore di conservazione. La loro durata, se conservati a 1-6 °C, dipende dalla soluzione anticoagulante - conservante utilizzata e dal metodo di preparazione.

### 1.6.2 Anticoagulanti e conservanti

Il sangue intero viene raccolto in una sacca che contiene una soluzione anticoagulante - conservante autorizzata dall'FDA, progettata per prevenire la coagulazione e per mantenere la vitalità e la funzione cellulare durante la conservazione. Il citrato previene la coagulazione chelando il calcio, inibendo così le varie fasi calcio - dipendenti della cascata coagulativa. La FDA approva la conservazione sino a 21 giorni, a 1-6 °C, del sangue prelevato in CPD. La maggior parte dei centri di raccolta, attualmente, preleva fino a 500 mL di sangue intero in sacche prodotte appositamente per contenere ampi volumi.

### 1.6.3 Conservazione di globuli rossi allo stato liquido

Quando gli eritrociti sono conservati fra 1-6 °C si verificano modificazioni biochimiche; tali modificazioni, alcune delle quali reversibili, contribuiscono alle "lesioni da conservazione" dei globuli rossi e ad una riduzione della vitalità, che influisce sulla cessione di ossigeno ai tessuti.

### 1.6.4 Ottenimento della soluzione anticoagulante - conservante

La soluzione anticoagulante - conservante utilizzata dall'Istituto dei Tumori di Milano è composta da SAG-mannitolo come conservante e da CPD come anticoagulante. Nelle tabelle successive (Tabella 1.2 e 1.3) sono indicate le proporzioni delle sostanze che compongono la soluzione e la relativa proporzione:

*Tabella 1.2 - Composizione del CPD [18]*

	<b>CPD</b>
Trisodio citrato	26.30 g
Acido citrico	3.27 g
Sodio diidrogeno fosfato	2.22 g
Destrosio	25.5 g
Aggiungere acqua fino a raggiungere	1 L

*Tabella 1.3 - Composizione del CPD-SAG Mannitolo [18]*

		<b>CPD-SAG Mannitolo</b>
	<u>Sacca primaria</u>	63 mL CPD
<u>Sacca additiva</u>	Cloruro di sodio	8.77 g
	Destrosio	8.99 g
	Adenina	0.16 g
	Mannitolo	5.25 g
	Acqua distillata fino a raggiungere	1L

Il pH della soluzione di CPD è pari a 5,6 mentre quello della soluzione SAG-Mannitolo è pari a 6,2. Di conseguenza il pH della soluzione CPD-SAG-Mannitolo risulta essere all'incirca di 5,9.



## 2 - TECNICHE DI INCAPSULAMENTO

### 2.1 Introduzione

Lo sviluppo di sistemi per la veicolazione di farmaci nel corpo umano (*drug delivery system*) è uno dei principali campi di ricerca di aziende e università di tutto il mondo. Diverse sono le attività necessarie per il raggiungimento dello scopo: realizzazione di nuovi materiali, sviluppo di farmaci più sicuri ed efficaci e messa a punto di tecniche standardizzate [1].

I vettori di farmaci (*drug carrier*) hanno il compito di trasportare e guidare la sostanza all'interno dell'organismo con tempi e modalità adeguate alla specifica applicazione. Nel dettaglio [2]:

- il farmaco deve esercitare la propria azione solo nel sito specifico, in modo da minimizzare la quantità di sostanza da incapsulare e limitare gli effetti tossici su organi e tessuti non interessati dalla terapia;
- il *carrier* deve essere scelto al fine di migliorare la farmacocinetica e la farmacodinamica delle molecole trasportate in modo da aumentare l'efficacia del processo;
- devono essere garantiti i corretti tempi di somministrazione ed eliminazione del farmaco all'interno del corpo umano.

I principali vettori naturali e sintetici progettati nel corso degli anni [3] sono riportati in Tabella 2.1.

**Tabella 2.1** - Caratteristiche principali dei vettori maggiormente utilizzati per il rilascio di farmaci

<i>Carrier Drug</i>	<b>Dimensioni [nm]</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Emivita</b>
Eritrociti murini	5000 ÷ 7000	Dischi biconcavi	10 ÷ 15 giorni
PEG-Liposomi	50 ÷ 500	Sfere	3 ÷ 6 ore
Polimerosomi	50 ÷ 500	Sfere	10 ÷ 20 ore
Filomicelle	40 x 20000	Filamenti	1 ÷ 3 giorni
Micelle polimeriche	20 ÷ 30	Sfere	0.1 ÷ 6 ore
Proteine e coniugati	5 ÷ 5000	Sfere irregolari	10 min ÷ 6 ore

## 2.2 Incapsulamento in globuli rossi

I globuli rossi sono i principali trasportatori di ossigeno del corpo umano e presentano caratteristiche specifiche che li rendono candidati ideali ad essere ottimi vettori di farmaco.

Tali caratteristiche sono:

- possibilità di raggiungere ogni distretto corporeo;
- possibilità di guidare i *carrier* verso siti specifici attraverso campi magnetici esterni che agiscono 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 [4];
- elevata biocompatibilità e assenza di reazioni immunologiche, specialmente nel caso in cui vengano utilizzate cellule autologhe [5-6];
- biodegradabilità, senza creazione e rilascio di prodotti tossici;
- vita media sufficientemente lunga, maggiore rispetto a quella di vettori tradizionali;
- elevata disponibilità di eritrociti nel corpo;
- protezione del farmaco da enzimi presenti nel sangue;
- protezione dell'organismo dalla possibile tossicità delle molecole incapsulate;
- possibilità di incapsulare una quantità significativa di molecole grazie all'assenza di nucleo nel globulo rosso, con conseguente diminuzione del numero di somministrazioni e aumento dell'intervallo di tempo tra due somministrazioni successive;
- possibilità di incapsulare molecole ad alto peso molecolare come polipeptidi e polisaccaridi;
- riduzione delle fluttuazioni della concentrazione di sostanza nel torrente ematico grazie al rilascio controllato;
- possibilità di rilasciare gli agenti incapsulati sia rapidamente, attraverso la lisi da parte del sistema del complemento, sia lentamente, tramite la diffusione della molecola attraverso la membrana o attraverso la sua graduale degradazione [3].

Negli ultimi 30 anni sono state studiate tecniche che permettono di incapsulare all'interno degli eritrociti molecole di diverso tipo (circa 50 tra enzimi e farmaci), anche di elevato peso molecolare. Sono stati creati, inoltre, anche dei sistemi in grado di utilizzare i globuli rossi

come bioreattori, in grado dunque di attivare farmaci, precedentemente incapsulati in forma inattiva [7]. In Tabella 2.2 sono riportati i principali enzimi incapsulati, la loro funzione e lo stato della ricerca attuale per ognuno di essi [3].

*Tabella 2.2 - Elenco dei principali enzimi incapsulati all'interno dei globuli rossi e attuale stato della ricerca*

Enzimi	Dim[KDa]	Funzione	Tipo di trattamento	Stato di studio
Galattosidasi	464	Degrada i galattosidi (zuccheri, lipidi e proteine)	Malattie di accumulo lisosomiale (LSD)	Studi su primati
Glucuronidasi	80	Degrada eparina e mucopolisaccaridi	LSD (malattia di Gaucher)	Studi su roditori
Glucocerebrosidasi	60	Degrada $\beta$ -glicosidi	LSD (malattia di Gaucher)	Test su uomo
Timidina fosforilasi	100	Converte timidina e fosfato in timina e 2-deossi-alfa-D-ribosio 1-fosfato	Deficienza mitocondriale genetica	Test su uomo
Anidrasi carbonica	30	Converte CO <sub>2</sub> in bicarbonato	Detossificazione della CO <sub>2</sub>	Studi <i>in vitro</i>
Uricasi	33	Ossida acido urico	Detossificazione dell'acido urico	Studi su topi
Tiosolfato-cianide solfotransferasi	37	Converte i cianidi in tiocianato	Detossificazione del cianide	Studi su animali
Fosfotioesterasi	15 ÷ 35	Idrolisi di tioesteri	Detossificazione dei composti organofosforici	Studi su topi
Alcool ossidasi	140 ÷ 600	Converte alcoli in aldeidi	Detossificazione degli alcoli	Studi su topi
Alcool deidrogenasi	80	Converte alcoli in chetoni e aldeidi	Detossificazione degli alcoli	Studi su topi
L-asparaginasi	80	Idrolizza asparagina in acido aspartico	Eradicazione dei tumori asparagina-dipendenti	Studi su topi, scimmie e uomo
Glutamina sintasi	Variabile	Forma glutamina a partire da glutamato e ammoniaca	Detossificazione dell'ammoniaca	Studi su animali
Adenosina deaminasi	47	Degrada l'adenosina	Eliminazione della deossiadenosina che inibisce cellule immunitarie nei pazienti con ridotto ADA	Studi su uomo

Tecniche innovative consentono di controllare il rilascio del farmaco attraverso *coating* presenti sulla membrana del globulo rosso. Variando il numero di strati depositati con la tecnica *Layer by Layer* è possibile ottenere somministrazioni più graduali nel tempo senza alterare né la funzionalità del farmaco né la conformazione del *carrier* [8].

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

- difficile standardizzazione del processo, dovuta alla grande variabilità di caratteristiche tra cellule di specie diverse e di soggetti diversi all'interno della stessa specie;
- difficoltà di conservazione nel tempo degli eritrociti carichi e rischio di contaminazione biologica durante le varie fasi di manipolazione delle cellule;
- possibile danneggiamento e conseguente aumento della fragilità osmotica e meccanica a seguito dei trattamenti cellulari;
- possibili alterazioni morfologiche e strutturali degli eritrociti durante le procedure di incapsulamento, con conseguente eliminazione rapida da parte del sistema reticolare endoteliale (RES, ossia siti di distruzione fisiologica dei globuli rossi), incrementando in tal modo la cinetica di rilascio del farmaco;
- eventuali problemi di tossicità dovuti ad un'eccessiva presenza di emoglobina libera nel plasma e ad un accumulo di globuli emolizzati negli organi filtro (reni e milza).

È stata recentemente proposta un'alternativa all'incapsulamento: l'accoppiamento del farmaco sulla superficie dei globuli rossi [3], minimizzando così il possibile danneggiamento causato dalle procedure di incapsulamento. Un evidente vantaggio di tale tecnica è la disponibilità della grande superficie esterna dell'eritrocita per il legame con proteine o macromolecole. Tuttavia, la non protezione del farmaco dall'ambiente esterno costituisce il principale limite di questa applicazione, ancora in fase di studio.

## 2.3 Applicazioni terapeutiche

Le applicazioni terapeutiche, relative all'utilizzo di globuli rossi come vettori di farmaci, su cui è stata ed è tuttora focalizzata maggiormente l'attenzione sono diverse:

- cura di tumori: incapsulamento di agenti chemioterapici e manipolazione 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 di interesse;
- attivazione del farmaco all'interno dell'eritrocita (funzione di bioreattore);
- incapsulamento di enzimi per la cura di patologie legate alla loro carenza o per la degradazione di composti nocivi derivanti da intossicazioni di varia natura;
- incapsulamento di vaccini per evitare iniezioni multiple e per diminuire le dosi utilizzate;
- incapsulamento di regolatori allosterici dell'emoglobina per incrementare la capacità di trasporto di ossigeno;
- incapsulamento di agenti di contrasto per risonanza magnetica (MRI).

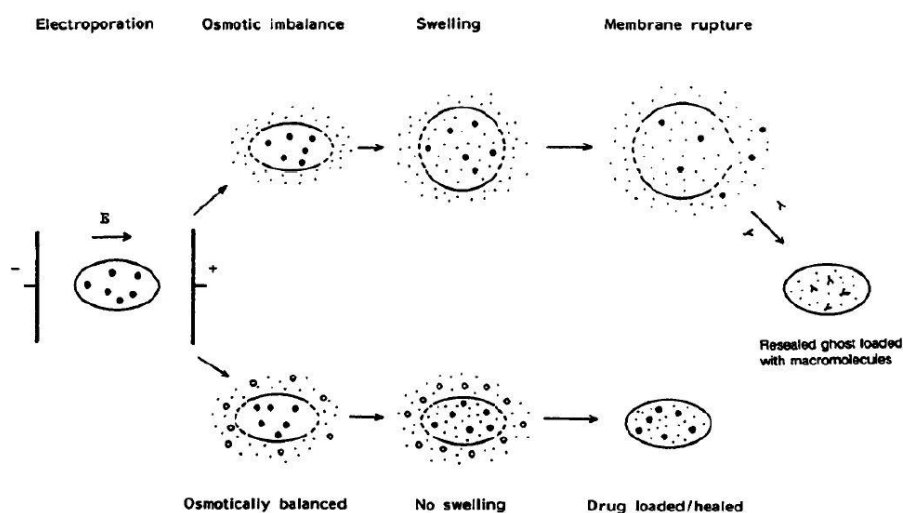
## 2.4 Tecniche di incapsulamento

I metodi attualmente in uso consistono nello sfruttare la permeabilità dello stroma per caricare molecole all'interno degli eritrociti attraverso diffusione passiva, a seguito dell'apertura dei pori. La ricerca è tuttora in corso per ottimizzare la resa di incapsulamento, accorciare i tempi del processo e minimizzare o eliminare eventuali danneggiamenti o alterazioni della membrana che potrebbero compromettere la funzionalità e vitalità della cellula lesa.

### 2.4.1 Elettroporazione

La tecnica dell'elettroporazione sfrutta la capacità di campi elettrici transienti ad alta intensità ( $1 \div 10$  kV/cm) e di breve durata ( $20 \div 160$   $\mu$ s) di provocare un momentaneo incremento della permeabilità della membrana del globulo rosso quando questo si trova in un'adeguata soluzione isotonica. In generale, più piccolo è il raggio della cellula, maggiore

è il campo elettrico che dev'essere applicato [9]. Il fenomeno è tempo - dipendente, soggetto dunque a cambiamenti sia nel numero di pori creati sia nella loro dimensione [10]. Ciononostante, se si lavora a una temperatura di 0 °C è possibile mantenere tale stato per un tempo sufficiente a consentire la diffusione del farmaco (30 ÷ 60 minuti). Incubando le cellule a 37 °C in una soluzione osmoticamente stabile, viene ripristinato lo stato originale delle cellule. Attraverso questa tecnica, le molecole diffuse vengono intrappolate all'interno dell'eritrocita con un'efficienza pari a circa il 35%. Le molecole rimaste nella soluzione esterna possono essere rimosse lavando la sospensione cellulare. L'intero processo è schematizzato in Figura 2.1.



*Figura 2.1 - Incapsulamento per elettroporazione [10]*

In generale, dopo la formazione dei pori sulla membrana, quest'ultima diventa permeabile al farmaco ma non ai composti citoplasmatici. Si instaura dunque uno sbilanciamento osmotico che crea un flusso di soluzione all'interno della cellula, che di conseguenza si rigonfia. Al fine di evitare la lisi cellulare, spesso si aggiunge alla soluzione una certa quantità di molecole con elevato peso molecolare in modo da bilanciare la pressione osmotica delle proteine, come schematizzato dal percorso inferiore della Figura 2.1. Questa tecnica necessita di un controllo accurato dei parametri di processo, in particolar modo del voltaggio applicato. Infatti, è facile indurre la morte cellulare in particolare per due motivi principali [11]:

- rottura della membrana a causa di un eccessivo numero di pori che si allargano con continuità;
- sbilanciamento chimico a causa dei flussi che si creano a cavallo della membrana e conseguente *swelling* cellulare.

Tale tecnica permette di lasciare inalterata la morfologia cellulare del globulo rosso, rendendo questi ultimi indistinguibili dai normali globuli una volta reinseriti nel torrente ematico. Essa necessita però di apparecchiature specifiche e permette di trattare solo piccole quantità di cellule.

### 2.4.2 Endocitosi indotta farmacologicamente

L'endocitosi è un processo fisiologico che permette alle cellule di inglobare piccole quantità di fluido extracellulare [6]. Se sottoposta a opportuni stimoli, la membrana cellulare crea una rientranza che nel tempo diventa sempre più pronunciata fino a originare una vera e propria vescicola quando i due lembi opposti si toccano e si fondono. Il fluido, le eventuali proteine, gli ioni, e le particelle che si trovano disciolte nel fluido rimangono dunque intrappolate all'interno della cellula.

Nel caso di interesse, ossia nei globuli rossi, tale fenomeno di endocitosi 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. Questa tecnica presenta il vantaggio di evitare la lisi cellulare e la perdita di sostanze citoplasmatiche, tuttavia esige un controllo rigido delle condizioni di lavoro affinché il fenomeno sia efficace. Nello specifico, la temperatura ottimale è attorno ai 37 °C (sotto i 23 °C e sopra i 37 °C non si osserva la formazione di vescicole) e il pH dev'essere mantenuto tra 7,9 e 8,1. La capacità di incapsulamento aumenta all'aumentare del tempo e della concentrazione del farmaco.

### 2.4.3 Metodi basati su processi osmotici

Questi metodi si basano su processi osmotici che avvengono a cavallo della membrana cellulare. In virtù dell'esistenza di un gradiente di concentrazione tra il fluido citoplasmatico e la soluzione extracellulare, si crea un flusso osmotico che tende a ristabilire l'equilibrio.

Ad esempio, una soluzione ipotonica può indurre l'ingresso di acqua per osmosi all'interno dei globuli rossi; in tal modo, la membrana viene sottoposta a trazione, i pori si aprono, il volume globulare aumenta e viene consentito l'ingresso delle molecole da incapsulare; ristabilito l'equilibrio osmotico, i pori si chiudono e il farmaco rimane intrappolato all'interno dell'eritrocita, che torna alla sua conformazione morfologica originale.

### 2.4.3.1 Metodo dell'impulso osmotico

Il metodo dell'impulso osmotico si basa sull'applicazione di brevi ma intensi stress osmotici [12]. Viene utilizzato generalmente DMSO (dimetilsolfossido) come sostanza in grado di creare un gradiente osmotico e, di conseguenza, in grado di causare l'apertura dei pori. Il processo risulta suddiviso in quattro fasi, rappresentate nella Figura 2.2.

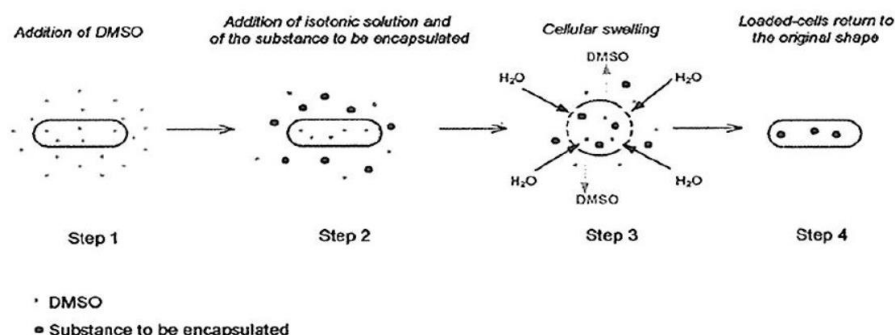


Figura 2.2 - Incapsulamento per impulso osmotico [12]

Le fasi di tale processo sono:

1. sospensione degli eritrociti in una soluzione isotonica di DMSO al fine di ottenere una pari concentrazione a cavallo della membrana ( $\approx 1500$  mOsm per 8% di DMSO);
2. diluizione della soluzione con un tampone isotonico contenente il farmaco da incapsulare: 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 il rigonfiamento dell'eritrocita. Per garantire la riuscita del processo, il flusso di DMSO dev'essere molto più lento del flusso d'acqua;



3. diffusione del farmaco attraverso i pori creatisi sullo stroma;
4. intrappolamento del farmaco all'interno del globulo rosso, una volta raggiunto l'equilibrio e una volta terminato il flusso di DMSO.

Questo metodo, pur non causando alterazioni alle cellule, richiede tempi molto lunghi e permette di trattare solo piccoli volumi di globuli rossi.

#### 2.4.3.2 Emolisi ipotonica

La tecnica dell'emolisi ipotonica è caratterizzata dalla presenza di un rapido flusso d'acqua verso l'interno del globulo rosso e di un lento efflusso salino. Di conseguenza, l'eritrocita assume una morfologia sferocitica e la membrana viene sottoposta a trazione [12, 13]. Fisiologicamente, la membrana è in grado di sopportare deformazioni corrispondenti ad un aumento di volume variabile tra il 50% e il 70%, mentre per valori maggiori si osserva il danneggiamento della stessa con formazione di pori dell'ordine di  $200 \div 500 \text{ \AA}$  che provocano la fuoriuscita del contenuto cellulare. Al di sotto di questo limite è possibile incapsulare farmaci: per ristabilire l'equilibrio i composti presenti all'esterno della membrana entrano nella cellula. Tornando alle condizioni isotoniche, l'eritrocita torna alla normale configurazione di discocita biconcavo, i pori si richiudono e il farmaco presente nella soluzione rimane intrappolato all'interno della cellula.

L'intera procedura (Figura 2.3) può essere riassunta come segue:

- gli eritrociti vengono estratti da sangue intero eparinizzato mediante centrifugazione in due step: inizialmente si separa il plasma dalla parte corpuscolata e poi si dividono i globuli rossi da piastrine e leucociti;
- gli eritrociti vengono sottoposti a lavaggi successivi;
- emolisi ipotonica;
- lavaggio delle cellule manipolate;
- sospensione delle cellule in plasma o PBS.

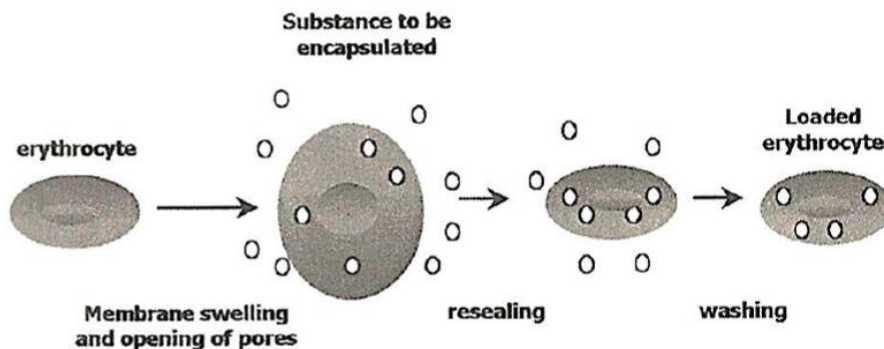


Figura 2.3 - Incapsulamento per emolisi ipotonica [12]

A seconda della procedura utilizzata per la fase di emolisi, si distinguono tre tecniche:

1. Diluizione ipotonica: per ogni unità di volume di eritrociti si aggiungono dai 2 ai 20 volumi di acqua o di soluzione ipotonica, contenenti la molecola da incapsulare. La soluzione viene lasciata a 0 °C per almeno 5 minuti, nel corso dei quali avviene l'incapsulamento. Tale metodo, rapido e di semplice esecuzione, è adatto per molecole a basso peso molecolare (fino a 130 KDa) ma ha lo svantaggio di provocare la perdita di contenuti cellulari, in particolar modo dell'emoglobina, con conseguente perdita di funzionamento cellulare. Si ottiene un'efficienza di incapsulamento attorno al 30% e viene garantito un recupero cellulare tra l'86% e il 100%.
2. Prerigonfiamento con diluizione: tale tecnica permette la riduzione della perdita dei contenuti cellulari grazie ad un procedimento in due fasi che riduce notevolmente il numero di cellule coinvolte in processi di lisi. Tale procedimento è rappresentato in Figura 2.4.

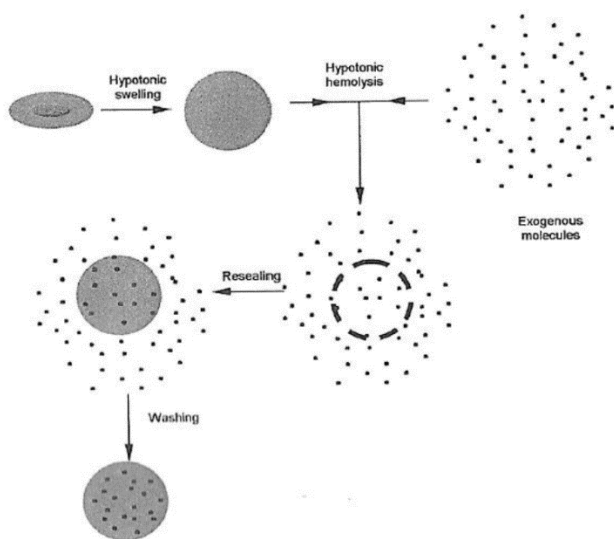
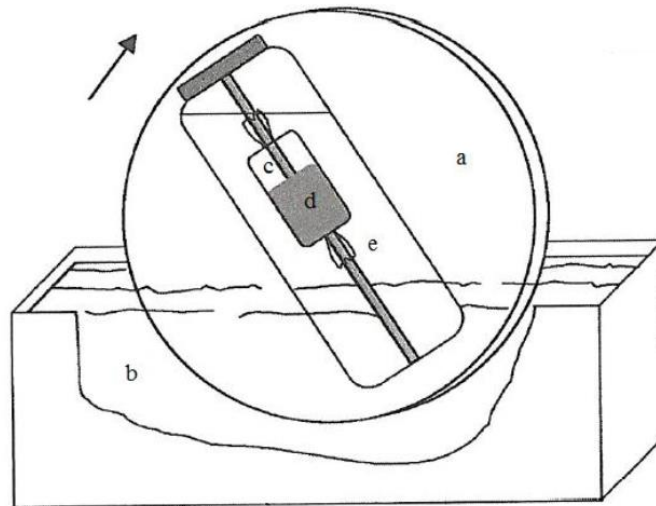


Figura 2.4 - Prerigonfiamento con diluizione [13]

Inizialmente viene indotto un aumento di volume preliminare ( $\approx 150\%$ ) mediante la sospensione degli eritrociti in una soluzione leggermente ipotonica di PBS, con rapporto eritrociti/liquidi pari a 1:5. Tramite lenta centrifugazione, le cellule vengono recuperate e la procedura viene ripetuta introducendo il composto da incapsulare e aumentando la pressione osmotica della soluzione. Questa fase avviene a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti. Le rese ottenute sono comprese tra il 30% e il 40%, con incrementi significativi nel caso di pretrattamento dei globuli con gluteraldeide. Il recupero cellulare varia tra il 60% e l'80%. I 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 [5, 14];

3. 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, ad una temperatura di circa  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La sacca viene riempita d'aria fino a un volume pari a circa il 25% del totale, viene sigillata e poi immersa in una soluzione ipotonica in continuo rimescolamento (50 volumi di soluzione per ogni volume di globuli rossi). Il processo di dialisi viene eseguito per un tempo che va dai 20 ai 180 minuti, al termine dei quali viene ristabilita l'isotonicità e gli eritrociti vengono fatti riposare per 30 - 60 minuti a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in modo da indurre la richiusura dei pori [6]. In Figura 2.5 è rappresentato uno schema dell'apparecchiatura utilizzata.

È necessario valutare la dimensione delle molecole prima di procedere con la dialisi: se il peso molecolare è maggiore della soglia di filtrazione della membrana la molecola dev'essere aggiunta prima della dialisi all'interno della sacca, altrimenti è necessario inserirla, prima o dopo la dialisi, nella soluzione tampone esterna alla sacca [15]. L'efficienza di incapsulamento, compresa tra il 31% e il 48%, è tanto maggiore quanto più elevato è il valore di ematocrito e quanto minore è il peso della molecola da incapsulare; inoltre essa dipende dalla capacità di provocare il minor numero possibile di alterazioni morfologico - funzionali [16, 17, 18].



**Figura 2.5** - Apparecchiatura per dialisi ipotonica: elemento rotante (a), bagno di acqua e ghiaccio (b), zona occupata da aria all'interno della sacca per dialisi (c), sospensione di eritrociti in soluzione tampone isotonica contenente le molecole da incapsulare (d), soluzione ipotonica esterna [15]

Per ottimizzare il processo, risulta importante controllare i tempi di dialisi, l'osmolarità della soluzione dializzante e quella della soluzione con la quale vengono lavati gli eritrociti alla fine del processo. Il recupero cellulare varia tra il 60% e il 90% a seconda dei parametri di lavoro [18, 19]. Il principale vantaggio di questa tecnica è l'assenza di alterazioni strutturali a livello di membrana cellulare [20].

#### 2.4.4 Incapsulamento mediante sforzi di taglio

La possibilità di incapsulare molecole all'interno di eritrociti tramite sollecitazioni meccaniche è stata dimostrata in numerosi studi [21-26]. Tale tecnica non si basa su processi fisico - chimici, bensì sull'applicazione di sforzi tangenziali, agenti sui globuli rossi, che nascono all'interno di un fluido che scorre in un condotto. Questi sforzi possono indurre l'apertura di pori a livello stromale e consentire la diffusione di molecole all'interno del globulo. Terminata la sollecitazione, le porosità spariscono e le sostanze rimangono incapsulate all'interno della cellula. Questo metodo, se confrontato con quelli precedentemente descritti, risulta più semplicemente realizzabile e permette il trattamento di volumi di sangue maggiori. Inoltre, è possibile utilizzare tale tecnica per realizzare un dispositivo in linea con il paziente e in grado di processare portate dell'ordine di 250 ÷ 500

mL/min, valori tipici di procedure di circolazione extracorporea. Il principale vantaggio è dato dal fatto che il sangue trattato non entra in alcun modo a contatto con l'ambiente esterno, evitando contaminazioni ed errori umani.

In tale ambito, le prime ricerche sperimentali [22] sono state effettuate presso il LaBS del Politecnico di Milano e sono state incentrate sulla verifica dell'effettiva possibilità di incapsulare molecole all'interno di globuli rossi sottoposti a una sollecitazione di taglio. È stato inizialmente progettato un setup sperimentale in cui il sangue veniva sollecitato all'interno di un capillare in vetro - pyrex con diametro interno pari a 0,6 mm. È stato utilizzato FITC-destrano 40S come molecola probante. La resa di incapsulamento ottenuta è stata pari al 6%, probabilmente a causa del materiale scelto per il capillare: da analisi al microscopio è stato osservato che i globuli rossi a contatto col vetro subiscono una trasformazione morfologica di tipo echinocitico, risultando quindi meno deformabili e limitando l'apertura dei pori.

Il successivo lavoro di tesi [23] ha modificato il setup sperimentale utilizzando un capillare in silicone con diametro interno di 0,5 mm e lunghezza di 12 m. Sono state effettuate diverse prove di emolisi mediante ripetuti passaggi della soluzione di eritrociti e molecole probanti attraverso il capillare. Paragonando l'efficacia di incapsulamento di ogni prova con il posizionamento dei valori sforzo di taglio - tempo di sollecitazione utilizzati, si è cercato di determinare le condizioni ottimali per l'incapsulamento. È stato osservato che, per avere le maggiori percentuali di incapsulamento di farmaco senza danneggiare in modo irreversibile il globulo rosso, è opportuno scegliere coppie sforzo - tempo in prossimità o di poco superiori alla retta di Tillmann (Figura 2.6). Prove sperimentali hanno permesso di osservare percentuali di incapsulamento elevate, con massimi del 30%.

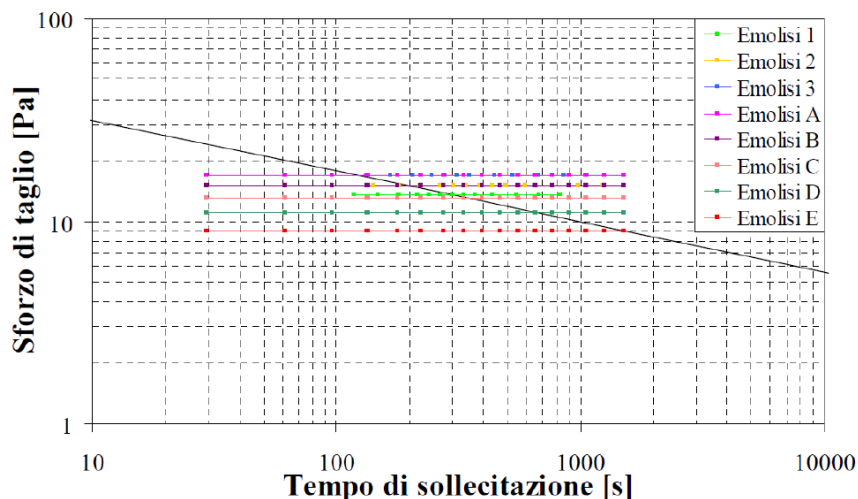


Figura 2.6 - Posizionamento delle prove di emolisi rispetto alla retta di Tillman [23]

Tali studi [22, 23, 26] hanno, dunque, dimostrato a livello macroscopico l'efficacia della tecnica di incapsulamento di molecole in eritrociti tramite l'applicazione di sforzi di taglio. I lavori successivi [21, 24, 25] si sono focalizzati sul ridimensionamento della scala di tale applicazione passando dal livello macroscopico al livello microscopico tramite l'utilizzo di canali di scala micrometrica.

In un precedente lavoro di tesi [21] è stato anche sviluppato un modello computazionale per comprendere la fluidodinamica nel capillare di sezione quadrata con lato  $50 \mu\text{m}$  all'interno del quale i globuli rossi vengono sottoposti a sollecitazione. In tal modo è stato possibile ottimizzare il processo di incapsulamento per le successive prove sperimentali. Sono state effettuate analisi di validazione della fluidodinamica con  $\mu\text{PIV}$  e analisi ulteriori per la quantificazione della percentuale di incapsulamento. È stato osservato come le ipotesi semplificative assunte nel modello computazionale trascurassero la natura deformabile dei globuli rossi, rendendo necessario lo sviluppo di un nuovo modello computazionale più completo, che comprendesse anche i fenomeni diffusivi. Le prove di incapsulamento hanno dimostrato la ragionevolezza del principio che sta alla base della tecnica, ma la resa inferiore al 5% costituisce ancora un limite non indifferente da considerare in vista di applicazioni future. Si pensa che lo scarso risultato di incapsulamento ottenuto sia dovuto principalmente ad una non adeguata preparazione della soluzione con la quale venivano miscelati i campioni di sangue forniti dall'Istituto Nazionale dei Tumori. Tale preparazione ha portato a un

fenomeno di echinocitosi massiva, rendendo dunque i globuli rossi meno predisposti per il processo di incapsulamento.

Risulta inoltre necessario sviluppare un nuovo chip con geometria e materiale progettati specificamente per il problema in esame, evitando ad esempio depositi di globuli rossi. Infine andrebbe sviluppata una nuova tecnica in grado di garantire un controllo migliore sugli sforzi di taglio a cui sono sottoposti gli eritrociti.

## 2.5 Confinamento di particelle in dispositivi microfluidici

Le tecniche di focalizzazione di particelle in dispositivi microfluidici si distinguono in: *Sheath Flow Focusing* e *Sheathless Focusing* [27]. La prima utilizza liquidi di confinamento laterali che permettono di focalizzare le particelle in sospensione, mentre invece la seconda si basa sull'applicazione di una forza, attiva o passiva, in grado di manipolare le particelle e dirigerle in un punto preciso del canale. La scelta del metodo ottimale di confinamento dipende dalle esigenze dell'applicazione specifica: efficienza, affidabilità, semplicità, velocità e effetti fisiologici. In Tabella 2.3 vengono riportati i principali metodi di focalizzazione di particelle in dispositivi microfluidici, ciascuno con la modalità di confinamento, le particelle utilizzate e le portate utilizzate per lo studio.

Tabella 2.3 - Metodi di focalizzazione di particelle in dispositivi microfluidici [27]

Classificazione	Metodi	Modalità di focalizzazione	Particelle	Portata [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Riferimenti
	Microcanali ottenuti con scanalatura	Fluido confinante e trasporto laterale	<i>Beads</i> di polistirene 5.6 $\mu\text{m}$	10	Golden et al. (2009)
<i>Sheath Flow focusing</i>	Dean flow controllato	Fluido confinante e vortici di Dean	RBC	1.67	Lee et al. (2009)
	Confinamento vertical	Confinamenti orizzontali e verticali	Linfociti T	4	Watkins et al. (2009)
	Acustico	Forza acustica	<i>Beads</i> di polistirene 1.9 $\mu\text{m}$	10	Shi et al. (2008)
<i>Sheathless Focusing Active</i>	Flusso asimmetrico	Forza di portanza indotta da un gradiente di velocità	<i>Beads</i> di polistirene 5 $\mu\text{m}$ , RBC	0.5	Kim and Yoo (2009)
	Dielettroforesi basato su elettrodo a corrente alternata	Dielettroforesi controllata esternamente	<i>Beads</i> di polistirene	0.01	Chu et al. (2009)
	Filtrazione idrodinamica	Flusso laminare	<i>Beads</i> di polistirene 5 $\mu\text{m}$	2	Aoki et al. (2009)
	Idroforesi	Circolazioni laterali	<i>Beads</i> di polistirene e cellule di Jurkat	4	Choi and Park (2008)
	Basato sull'inerzia con microcanali dritti	Forze inerziali di portanza	<i>Beads</i> di polistirene 7 $\mu\text{m}$	140	Park et al. (2009)
<i>Sheathless Focusing Passive</i>	Basato sull'inerzia con microcanali curvi	Forze inerziali di portanza e forze di trascinamento di Dean	<i>Beads</i> , gocce d'olio, RBC	20	Di Carlo et al. (2007)
	Dielettroforesi basata su isolante con microcanali dritti	Dielettroforesi indotta internamente dalla topologia del canale	<i>Beads</i> di polistirene	5	Zhu and Xuan (2009)
	Dielettroforesi basata su isolante con microcanali curvi		<i>Beads</i> di polistirene	0.1	Zhu and Xuan (2009)



## 2.6 Valutazione delle prove di incapsulamento

A seguito delle prove di incapsulamento, è necessario valutare se e come siano cambiate le proprietà degli eritrociti dopo il caricamento del farmaco. In particolare, le caratteristiche chimico - fisiche influenzano non solo il comportamento *in vivo* della cellula ma anche, una volta rimessa in circolo, la cinetica di rilascio della sostanza incapsulata. Gli aspetti che vanno analizzati per determinare le proprietà delle cellule dopo la manipolazione sono:

- morfologia della cellula: è necessario che le cellule mantengano la forma a disco biconcavo, minimizzando il numero di stomatociti, sferociti ed echinociti. Le dimensioni della cellula non devono essere troppo superiori o inferiori rispetto a quelle fisiologiche. Tramite l'analisi al SEM è possibile valutare la morfologia e stimare il diametro medio delle cellule;
- integrità dello stroma: la membrana cellulare non deve aver subito un eccessivo infragilimento. Come verifica, è possibile effettuare prove di resistenza osmotica e meccanica paragonando i risultati di cellule trattate e non. Nel primo caso si utilizza una sospensione di globuli rossi in soluzione ipotonica di NaCl e si valuta il rilascio nel tempo dell'emoglobina. Nel caso della resistenza meccanica, invece, si valuta il comportamento dell'eritrocita se sottoposto a un flusso turbolento, misurando anche in questo caso l'emoglobina libera;
- deformabilità del globulo rosso: viene stimata misurando il tempo di passaggio dell'eritrocita all'interno di un capillare di larghezza pari a circa 4  $\mu\text{m}$  e di lunghezza nota.

Per quantificare la distruttività della procedura di incapsulamento, vengono determinati tre indici: il volume corpuscolare medio (MCV), il contenuto medio di emoglobina (MCH) e la concentrazione media all'interno di una singola cellula (MCHC). A seconda della tecnica utilizzata, si osserva un minore o un maggiore decremento di questi indici, tranne nel caso dell'endocitosi indotta farmacologicamente che non ne comporta variazioni significative [28].

## 3 - MATERIALI E METODI

### 3.1 Modello computazionale

La fluidodinamica computazionale è uno strumento numerico sia viene utilizzato come base di partenza per la messa a punto di molti processi sia in ambito industriale che di ricerca. Con tale approccio è possibile prevedere, controllare e ottimizzare grandezze e parametri che influenzano i risultati delle analisi. Tale sistema permette di effettuare prove sperimentali solo in un ristretto range di condizioni di lavoro, determinato dagli studi preliminari di natura computazionale, evitando così la realizzazione di lunghi e costosi setup e prototipi sperimentali.

Lo studio dei processi di incapsulamento di molecole probanti in eritrociti per mezzo di sollecitazioni meccaniche, richiede un'analisi preliminare della fluidodinamica all'interno di capillari micrometrici, in modo da definire i parametri ottimali per la realizzazione del set-up sperimentale.

L'obiettivo principale del modello computazionale è dunque quello di definire le portate da impostare a livello sperimentale in modo da definire la migliore coppia di valori  $\tau - t$  in riferimento alla geometria scelta. In seguito, si dovrà valutare la combinazione ottimale di tutti i parametri caratteristici delle prove sperimentali tra i quali: ematocrito, percentuale di confinamento, portate, sforzi di taglio e perdite di carico, garantendo adeguati tempi di diffusione della molecola all'interno dell'eritrocita.

#### 3.1.1 Descrizione generale del modello computazionale

Il modello computazionale implementato è stato definito in modo tale da riprodurre nella maniera più fedele possibile il banco prova che verrà utilizzato a livello sperimentale. Il banco prova utilizzato negli studi precedenti [1] risulta costituito da un capillare micrometrico con sezione trasversale quadrata, una pompa a siringa, una riserva nella quale raccogliere il sangue in uscita e da tubi di connessione. Il banco prova utilizzato nel seguente lavoro prevede invece la presenza di due pompe a siringa e di un chip micrometrico a tre vie, utilizzato per andare a effettuare prove di confinamento del flusso, al fine di massimizzare

la percentuale di incapsulamento. Nel caso di capillari di dimensioni micrometriche, i flussi che si instaurano sono esclusivamente laminari.

I modelli fluidodinamici utilizzati sono tutti in regime stazionario, in modo da eliminare la tempo - dipendenza, semplificando così la risoluzione delle equazioni alle derivate parziali.

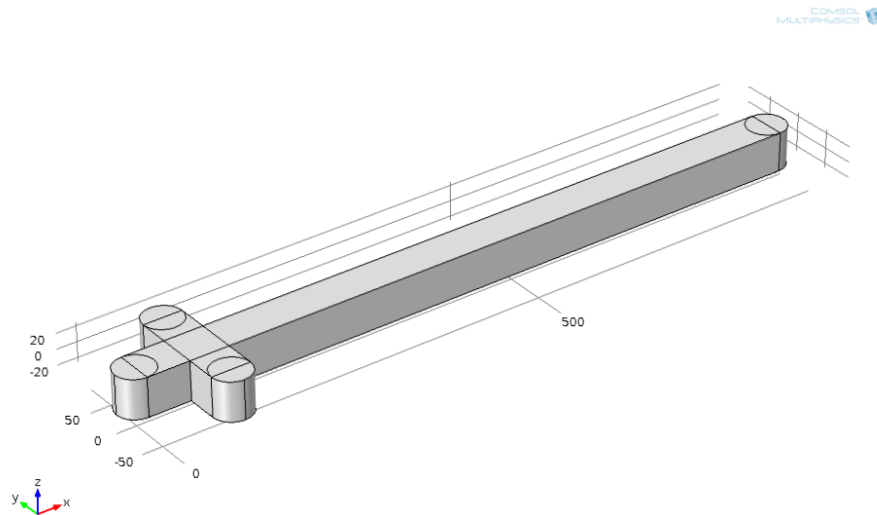
Il modello computazionale è stato realizzato utilizzando il software COMSOL Multiphysics 4.2a (COMSOL AB, Stockholm Sweden).

### 3.1.1.1 Geometria, materiali e mesh

Il modello computazionale riproduce, a livello geometrico, un capillare micrometrico in PMMA con sezione quadrata di 50 x 50 µm e lungo 87 mm. L'ingresso e l'uscita del capillare sono sezioni circolari con raggio di 25 µm. Il capillare presenta due canali laterali 50 x 50 µm per i flussi di confinamento con ingressi costituiti da sezioni circolari anch'esse con raggio di 25 µm. Uno studio precedente [1] ha dimostrato come i risultati computazionali del modello non variano a fronte di un ridimensionamento di 100 volte della lunghezza del canale. A tal proposito, per verificare che il caso in esame non differisse dagli studi precedenti, è stata stimata tramite calcoli analitici l'*Entry Length*, sulla base dell'equazione definita per moti laminari:

$$L = 0,056 \cdot Re_D \cdot D \quad (3.1)$$

Tale valore, che rappresenta la lunghezza a partire dalla quale il profilo parabolico di velocità risulta completamente sviluppato, è pari a 33,7 µm ed è minore della lunghezza totale del capillare impostata. Alla luce di tali considerazioni, poiché  $L < l_{cap}/100$ , si è scelto di effettuare gli studi computazionali utilizzando un capillare con lunghezza definita pari a 87/100 mm (Figura 3.1). Gli studi dei parametri più significativi sono stati effettuati in corrispondenza di  $l_{cap}/2$ , ossia laddove il moto risulta essere completamente sviluppato.



**Figura 3.1** - Modello geometrico del capillare

Il fluido modellizzato erogato dall'ingresso principale è una sospensione di globuli rossi in PBS (*phosphate buffer saline*), una soluzione usata in ambito biologico per garantire isotonicità ed evitare emolisi osmotica degli eritrociti. Il fluido modellizzato erogato dai canali laterali è invece una soluzione pura di PBS. In Tabella 3.1 si riportano le grandezze caratteristiche necessarie al software per definire il fluido di lavoro.

**Tabella 3.1** - Valori di densità e viscosità per PBS e RBC

	Densità [kg/m <sup>3</sup> ]	Viscosità [Pa·s]
PBS	1000	1.05·10 <sup>-3</sup>
RBC	1090	/

Il dominio fluido è stato discretizzato attraverso un'opportuna *mesh*. Gli elementi usati sono di tipo tetraedrico, più adatti a seguire una geometria caratterizzata sia da parti rettilinee che curvilinee. E' stato effettuato uno studio di sensitività su griglie diverse, al termine del quale si è scelto di utilizzare una mesh a 56598 elementi, in grado di garantire un errore minimo con tempi di calcolo ragionevoli. Come evidente dalla Tabella 3.2 e dai grafici di Figura 3.2, si è ritenuto ragionevole scegliere tale numero di elementi poiché, all'aumentare degli elementi stessi, non si è osservata alcuna differenza significativa dei parametri di interesse ( $T_s$  = tempo di simulazione,  $\Phi_{d, \max}$  = massima frazione della fase dispersa,  $v_{\max}$  = velocità massima,  $\tau_{\max}$  = sforzo di taglio massimo,  $\bar{\tau}$  = sforzo di taglio medio).

Tabella 3.2 - Studio di sensitività su diverse mesh

N° elementi	T <sub>s</sub> [s]	Φ <sub>d, max</sub>	v <sub>max</sub> [m/s]	τ <sub>max</sub> [Pa]	τ̄ [Pa]
17443	396	0,086	1,905	482,143	206,215
26959	373	0,094	1,876	479,676	202,991
45707	621	0,102	1,861	485,844	201,448
<b>56598</b>	<b>721</b>	<b>0,101</b>	<b>1,852</b>	<b>476,076</b>	<b>200,535</b>
104387	1396	0,106	1,846	481,766	199,718

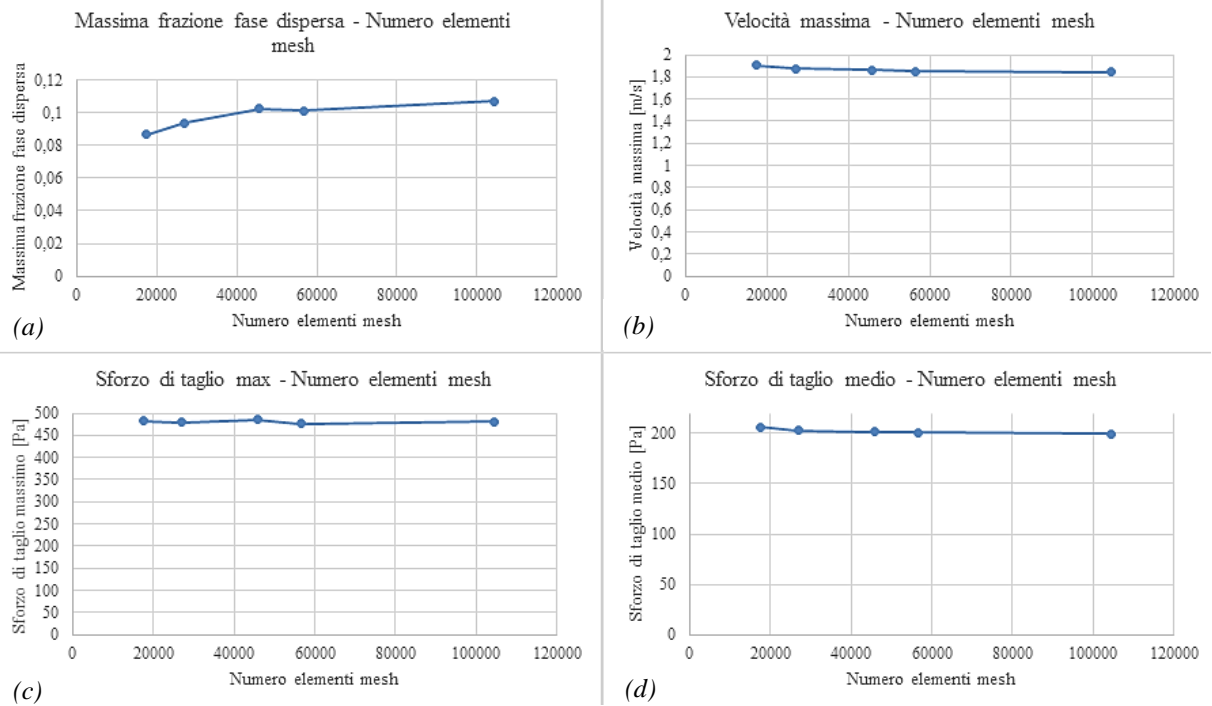


Figura 3.2 - Studio di sensitività dei parametri di interesse al variare del numero di elementi della mesh: grafico “massima frazione fase dispersa - numero elementi mesh” (a); grafico “velocità massima - numero elementi mesh” (b); grafico “sforzo di taglio massimo - numero elementi mesh” (c); grafico “sforzo di taglio medio - numero elementi mesh” (d)

### 3.1.1.2 Condizioni di esercizio

I parametri di lavoro sono stati scelti a partire da studi precedenti [1-6], successivamente modificati per tenere conto delle ipotesi effettuate. Le simulazioni sono state svolte variando due diversi parametri in un *range* predefinito:

- ematocrito variabile tra 1% , 5% e 10% ;
- percentuale di confinamento e portate in ingresso: pari al 25% (caso A), 50% (caso B) e 75% (caso C), dove questi valori rappresentano in percentuale la sezione occupata dalla portata centrale rispetto alla sezione complessiva del canale, tramite una scelta opportuna della portata d'ingresso centrale rispetto a quelle laterali.

Per ottenere uno studio completo della fluidodinamica all'interno del capillare si è deciso di usare due modelli di risoluzione diversi, previsti dal software COMSOL: *Mixture Model*, *Laminar Flow* e *Laminar Flow Model*.

### 3.1.2 Mixture Model, Laminar Flow

Il *Mixture Model* viene utilizzato per modellizzare miscele composte da particelle immerse in un liquido. Si distinguono due fasi: una “continua”, costituita dal liquido che rappresenta la parte portante della miscela, e una “dispersa”, caratterizzata dalle particelle che possono, a loro volta, essere solide o liquide (gocce). Le variabili risolte sono la pressione, il campo di velocità  $\mathbf{u}$  e la frazione volumetrica della fase dispersa  $\Phi_d$ .

Questo modello permette di trattare fluidi non newtoniani, caratteristica molto importante per lo studio in esame, ma introduce anche alcune ipotesi:

- la densità delle fasi è assunta come costante in ogni punto;
- entrambe le fasi sono sottoposte allo stesso campo di pressioni;
- la velocità relativa tra le fasi è calcolata mediante un bilancio tra pressioni, gravità e forze di trascinamento viscoso;
- le particelle sono modellizzate come rigide e sferiche, con diametro pari a 8  $\mu\text{m}$ .

L'ultima ipotesi risulta essere la più stringente per l'applicazione in esame: non è possibile infatti descrivere i globuli rossi come particelle deformabili a disco biconcavo.

Le equazioni alla base del modello sono:

- Navier-Stokes nelle tre direzioni;
- trasporto per  $\Phi_d$ ;
- continuità per la miscela.

### 3.1.2.1 Condizioni iniziali

Affinché fossero garantite delle condizioni di convergenza, i valori iniziali sono stati impostati in modo da essere molto prossimi a quelli della soluzione attesa, con ordini di grandezza e profili ragionevoli.

La velocità lungo la direzione preferenziale del flusso è stata implementata con un profilo parabolico tridimensionale, con valore medio:

$$\bar{u} = \frac{Q}{A_{\text{trav\_cap}}} \quad (3.2)$$

dove  $Q$  è la portata [ $\text{m}^3/\text{s}$ ] e  $A_{\text{trav\_cap}}$  è l'area della sezione trasversale del capillare [ $\text{m}^2$ ].

La pressione lungo l'asse  $x$  del capillare è stata impostata come decrescente sulla base della seguente formula:

$$p = p_{\text{inlet}} \cdot \left(1 - \frac{x}{l_{\text{cap}}}\right) \quad (3.3)$$

dove  $p_{\text{inlet}}$  è la pressione all'ingresso [Pa] e  $l_{\text{cap}}$  è la lunghezza del capillare [m].

La frazione in volume della fase dispersa è pari all'ematocrito impostato per ogni singola simulazione numerica.

### 3.1.2.2 Condizioni al contorno

Sono state definite condizioni al contorno sia per quanto riguarda la fase continua sia per quella dispersa, in modo da riprodurre nel modo più fedele possibile le variabili presenti nel set-up sperimentale.

In parete viene impostata la condizione di non scivolamento del fluido (*no - slip condition*) per la fase continua e assenza di flusso per la fase dispersa.

Nei tre ingressi è stata imposta una velocità iniziale costante nella sola direzione z, perpendicolare alla sezione circolare in ingresso al capillare, e pari a:

$$u_{centrale} = - \frac{Q_{centrale}}{A_{in\_cap}} \quad (3.4)$$

$$u_{laterale} = - \frac{Q_{laterale}}{A_{in\_cap}} \quad (3.5)$$

dove  $Q_{centrale}$  è la portata relativa al flusso centrale [ $m^3/s$ ],  $Q_{laterale}$  è la portata relativa ai flussi laterali [ $m^3/s$ ] e  $A_{in\_cap}$  è l'area degli ingressi del capillare [ $m^2$ ].

La frazione in volume è stata posta pari a zero per quanto riguarda gli ingressi laterali di solo PBS e, invece, pari all'ematocrito per quanto riguarda l'ingresso centrale.

In uscita, la miscela ha pressione nulla e vi è assenza di sforzi viscosi mentre le particelle hanno velocità pari a quella che avevano all'interno del capillare (*Dispersed phase outlet*).

### 3.1.2.3 Mixture Viscosity Model

Per determinare la viscosità complessiva della miscela è stata utilizzata l'equazione di Krieger, comunemente usata in combinazione con il *Mixture Model, Laminar Flow*:

$$\mu = \mu_c \left(1 - \frac{\Phi_d}{\Phi_{max}}\right)^{-2.5\Phi_{max}\mu^*} \quad (3.6)$$

dove  $\mu_c$  è la viscosità della fase continua (Pa·s),  $\Phi_d$  è la frazione in volume della fase dispersa ( $m^3/m^3$ ) e  $\mu^*$  vale 1 per le particelle rigide.

I coefficienti sono stati ottimizzati al caso in esame. Nello specifico, ossia nel caso in cui la fase dispersa è costituita da particelle sferiche, il valore di  $\Phi_{max}$  è stato impostato pari a 0,62. Questo parametro, detto "*maximum packing concentration*", rappresenta la frazione volumetrica occupata dalle particelle se queste fossero disposte in modo da minimizzare lo spazio tra loro. I globuli rossi, infatti, possono deformarsi e aggregarsi in *rouleaux* in condizioni di bassi valori di *shear rate*, andando così ad annullare quasi completamente lo



spazio compreso tra di loro. Aumentando il valore di  $\Phi_{max}$  si hanno variazioni significative nella viscosità della miscela, specialmente per valori di ematocrito superiori allo 0,25 [6].

### 3.1.3 Laminar Flow Model

Questo modello permette di riprodurre il comportamento di un fluido in qualsiasi sistema, purché il flusso sia laminare. Il fluido risulta composto da una sola fase e le variabili che vengono risolte sono la pressione  $p$  e il vettore velocità  $\mathbf{u}$ .

Il fluido trattato è una miscela di PBS e globuli rossi ed è stato modellizzato utilizzando le variabili di viscosità e densità. Sono dunque state definite le seguenti grandezze rappresentative della miscela:

- densità della miscela:

$$\rho_{mix} = (1 - Ht \cdot \rho_f) + Ht \cdot \rho_{RBC} \quad (3.7)$$

dove  $Ht$  è l'ematocrito e  $\rho_f$  e  $\rho_{RBC}$  sono le densità di fluido e globuli rossi;

- viscosità della miscela, definita attraverso l'equazione di Krieger:

$$\mu_{mix} = \mu_f \cdot \left(1 - \frac{Ht}{0.62}\right)^{(-2.5 \cdot 0.62)} \quad (3.8)$$

dove  $H_t$  è l'ematocrito e  $\mu_f$  è la viscosità del fluido.

Le condizioni iniziali sono state impostate nulle sia per il campo di velocità sia per le pressioni, data la semplicità intrinseca del modello.

#### 3.1.3.1 Condizioni al contorno

Le condizioni al contorno sono state impostate nel seguente modo:

- agli ingressi è stata definita una portata massica del fluido  $\dot{m}$ , pari a:

$$\dot{m}_{centrale} = Q_{centrale} \cdot \rho_{RBC+PBS} \quad (3.9)$$

$$\dot{m}_{laterale} = Q_{laterale} \cdot \rho_{PBS} \quad (3.10)$$

dove  $Q_{centrale}$  è la portata centrale di fluido [ $m^3/s$ ],  $Q_{laterale}$  è la portata laterale dei fluidi di confinamento [ $m^3/s$ ],  $\rho_{RBC+PBS}$  è la massa volumica della miscela centrale [ $kg/m^3$ ] e  $\rho_{PBS}$  è la massa volumica delle miscele laterali [ $kg/m^3$ ];

- in uscita è stata imposta pressione nulla e assenza di sforzi viscosi;
- in parete è stata imposta la condizione di *no - slip*, ossia assenza di movimento di fluido a diretto contatto con la superficie del capillare.

## 3.2 Modello di diffusione della molecola

Il processo di incapsulamento prevede che, a seguito dell'applicazione di sforzi di taglio sulla superficie dei globuli rossi, si abbia la formazione di pori sulla membrana. Questi pori devono rimanere aperti per un tempo sufficientemente lungo a garantire la completa diffusione della molecola. È stato dunque definito un modello che si adattasse al problema in esame.

### 3.2.1 Distanza di diffusione

Per stimare lo spazio percorso dalla singola molecola è stato utilizzato un modello che, ipotizzando una distribuzione omogenea di globuli rossi nel fluido, associ a ciascun eritrocita una frazione del volume del capillare, calcolata come:

$$V_{rappr} = \frac{V_{cap\_RBC}}{n_{RBC}} \quad (3.11)$$

dove  $V_{rappr}$  è il volume rappresentativo occupato da ciascun globulo,  $V_{cap\_RBC}$  è il volume totale del capillare occupato dalla miscela di PBS e RBC, ossia il volume relativo alla portata d'ingresso centrale, e  $n_{RBC}$  è il numero di globuli rossi presenti.

Il volume totale di capillare occupato dalla miscela di PBS e RBC è definito come:

$$V_{cap\_RBC} = l \cdot w_{RBC} \cdot h \quad (3.12)$$

dove  $l$  è pari alla lunghezza del capillare a partire dalla regione a valle degli ingressi laterali,  $w_{RBC}$  è la larghezza della sezione confinata e  $h$  è l'altezza del capillare. Tale valore è una funzione della percentuale di confinamento, per cui variabile al variare del fattore  $w_{RBC}$ .

Il numero di globuli rossi presenti nel capillare può essere calcolato come:

$$n_{RBC} = \frac{(Ht \cdot V_{cap\_RBC})}{V_{RBC}} \quad (3.13)$$

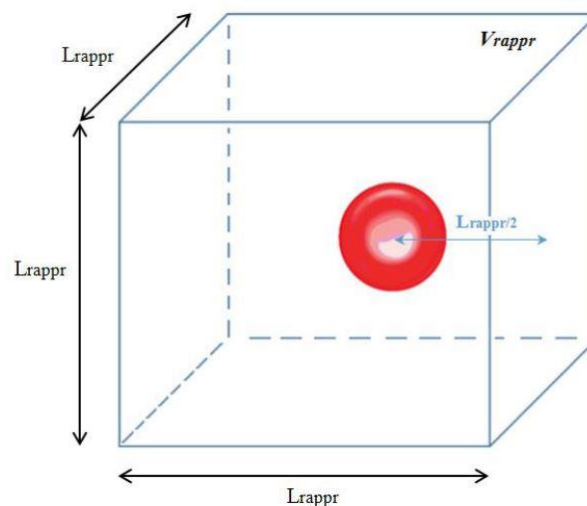
dove  $V_{RBC}$  rappresenta il volume del singolo globulo rosso, pari a circa  $94 \mu\text{m}^3$ .

Sulla base delle equazioni definite, è possibile esprimere il volume rappresentativo nel seguente modo:

$$V_{rappr} = \frac{V_{cap\_RBC}}{n_{RBC}} = \frac{V_{RBC}}{Ht} \quad (3.14)$$

evidenziando dunque come il volume rappresentativo non sia una funzione del volume del capillare, bensì una funzione dell'ematocrito: a parità di volume confinato, infatti, all'aumentare dell'ematocrito aumenta il numero dei globuli rossi con conseguente diminuzione del volume rappresentativo.

Il modello prevede la divisione del volume occupato dalla miscela di PBS e RBC in tanti cubi adiacenti contenenti ciascuno un globulo rosso, posto al centro del cubo stesso, come mostrato in Figura 3.3.



**Figura 3.3** - Volume rappresentativo di fluido occupato da ciascun globulo rosso

La distanza massima di diffusione per una molecola viene stimata pari a metà del lato del volume rappresentativo:

$$d_{diff} = \frac{\sqrt[3]{V_{rappr}}}{2} = \frac{l_{rappr}}{2} \quad (3.15)$$

dove  $l_{\text{rapp}}$  è il lato del cubo che costituisce il volume rappresentativo.

Tale modello si basa sull'ipotesi secondo la quale gli eritrociti si dispongono omogeneamente all'interno del capillare. In realtà i globuli rossi tendono a concentrarsi verso l'asse del condotto a causa dei campi di velocità agenti alle estremità della cellula. In tal modo, si osserverebbe una riduzione della distanza cellula - cellula e, dunque, del volume rappresentativo. Di conseguenza diminuirebbe anche la distanza che la singola molecola deve percorrere per entrare nel globulo e il tempo di diffusione. Un'ulteriore ipotesi imposta è la distribuzione omogenea della molecola probante utilizzata. Tale ipotesi non permette di considerare il possibile fenomeno del "*pinch - effect*", secondo il quale, soprattutto per alti valori di ematocrito, il destrano tende a concentrarsi maggiormente vicino alla parete, nell'area lasciata libera dai globuli rossi. E' tuttavia da considerare il fatto che per gli studi effettuati i valori di ematocrito non siano mai elevati (massimo valore pari al 10%) e che il destrano è disciolto nella soluzione.

### 3.2.2 Tempo di diffusione

Il tempo di diffusione di una molecola all'interno di una soluzione viene valutato sulla base dell'equazione:

$$t_{diff} = \frac{d_{diff}^2}{q_i \cdot D} \quad (3.16)$$

dove  $q_i$  è una costante numerica il cui valore dipende dalle dimensioni spaziali (pari a 6 nel caso di diffusione tridimensionale) e  $D$  rappresenta il coefficiente di diffusione [ $\text{m}^2/\text{s}$ ] pari a:

$$D = \frac{k \cdot T}{f} \quad (3.17)$$

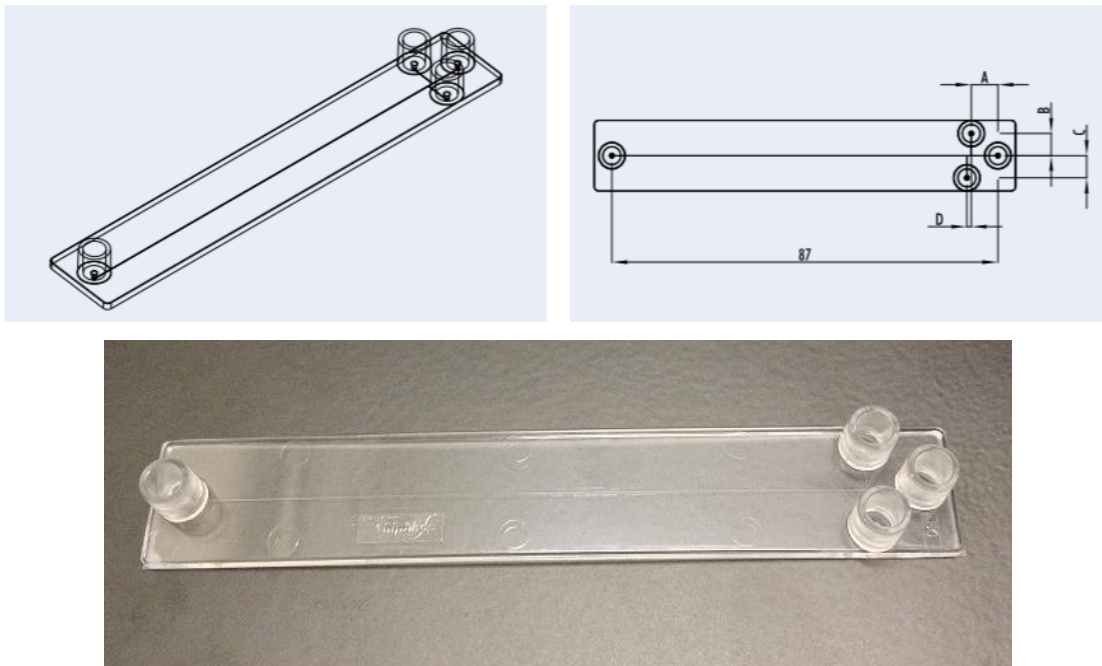
dove  $k$  è la costante di Boltzman, pari a  $1,381 \cdot 10^{-23}$  [J/K],  $T$  è la temperatura [K] e  $f$  è il "*frictional coefficient*" [ $\text{Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}$ ] e vale:

$$f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \quad (3.18)$$

dove  $\eta$  è la viscosità cinematica del fluido [Pa·s] e  $r$  è il raggio della particella sferica che diffonde nel mezzo [m]. Il valore della viscosità del fluido viene fatto coincidere con quello del PBS, pari a  $1,05 \cdot 10^{-3}$  Pa·s, e la temperatura è stata posta pari a 20 °C (293,15 K).

### 3.3 Protocollo di prova: tenuta del circuito

Le prove sperimentali di tenuta del circuito sono state effettuate utilizzando microcapillari con ingresso a croce (*Cross-shaped Channel Chips*, Microfluidic Chip Shop, Jena, Germany), progettati in modo da instaurare flussi di confinamento. I chip, sopra i quali si trovano i microcapillari con ingresso a croce, e i microcapillari stessi sono realizzati in PMMA. Questi ultimi presentano una lunghezza pari a 87 mm e una sezione quadrata con lato 50  $\mu$ m (Figura 3.4). Come evidente in figura, gli ingressi laterali sono posizionati ad una distanza longitudinale (A) dall'ingresso centrale pari a 6 mm e ad una distanza trasversale (B e C) dall'ingresso centrale pari a 5 mm.



**Figura 3.4** - Microcapillare con ingresso a croce (*cross-shaped channel chips*)

I microcapillari presentano connessioni di tipo standard (Luer) sia all'ingresso sia in uscita. Il sistema viene alimentato da una o due pompe a siringa (Harvard Apparatus PHD modello 2000, Massachusetts, USA), sulle quali vengono montate siringhe in vetro (HAMILTON GASTIGHT SYRINGES, Nevada, USA) di volume variabile a seconda della prova. Gli aghi

da siringa utilizzati (PiC, Artsana S.p.A, Grandate (Co), Italia) presentano un diametro pari a 18 G. Le connessioni microcapillare-siringhe vengono effettuate tramite l'utilizzo di tubo in silicone (Microfluidic Chip Shop, Jena, Germany) dal diametro interno pari a 760 µm.

Per determinare la pressione limite applicabile ai chip in esame è stato dunque necessario effettuare delle prove preliminari di tenuta del circuito. Sono state effettuate diverse prove di tenuta, ciascuna caratterizzata da uno specifico circuito. In Tabella 3.3 vengono riportate le caratteristiche principali delle prove di tenuta effettuate.

*Tabella 3.3 - Caratteristiche principali delle prove di tenuta*

<b>Prova di tenuta</b>	<b>Numero di pompe a siringa</b>	<b>Numero di siringhe</b>	<b>Numero di connessioni</b>
Prova TIPO 1	1	2	13
Prova TIPO 2	1	1	3
Prova TIPO 3	1	2	5
Prova TIPO 4	1	3	7
Prova TIPO 5	2	3	7

Sono stati definiti i valori delle portate (centrali e laterali) da impostare in modo da indurre delle perdite di carico comprese tra un minimo di 1 atm e un massimo di 5 atm, con un intervallo tra ogni singola prova parti a 1 atm. Tali valori sono stati stimati analiticamente tramite la formula di Poiseuille, assumendo come fluido di lavoro l'acqua distillata ( $\mu = 0,001 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ):

$$Q = \frac{\Delta P \cdot \pi \cdot D^4}{128 \cdot \mu \cdot L} \quad (3.19)$$

dove D rappresenta il diametro equivalente del condotto,  $\mu$  la viscosità dell'acqua distillata e L la lunghezza totale del microcapillare.

Le portate totali corrispondenti alle varie perdite di carico sono rappresentate in Tabella 3.4.

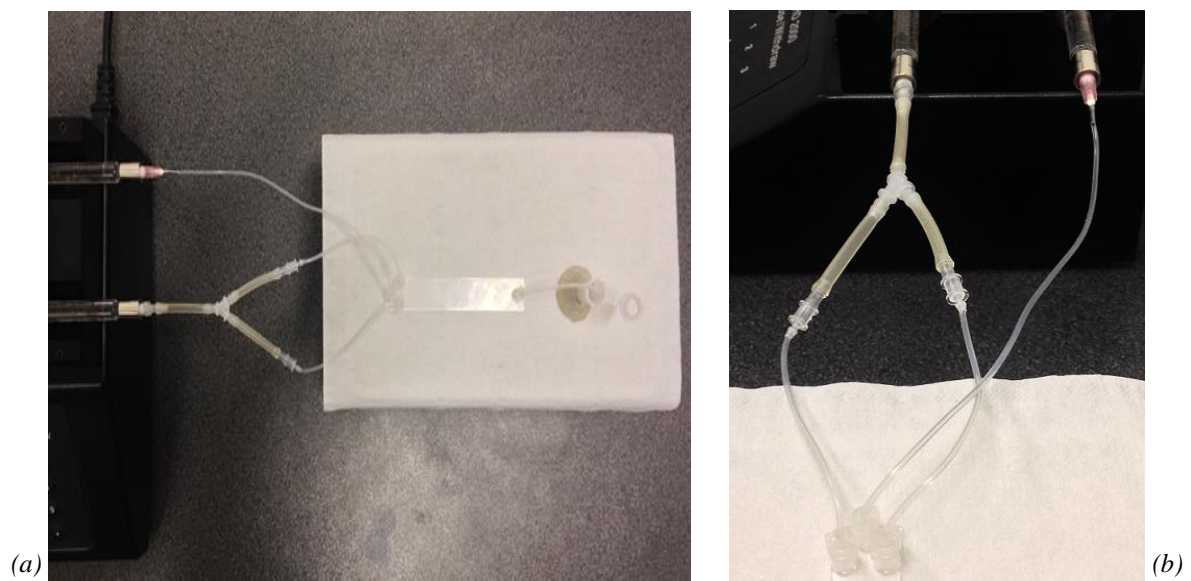
**Tabella 3.4** - Perdite di carico e corrispondenti portate totali imposte nel microcanale

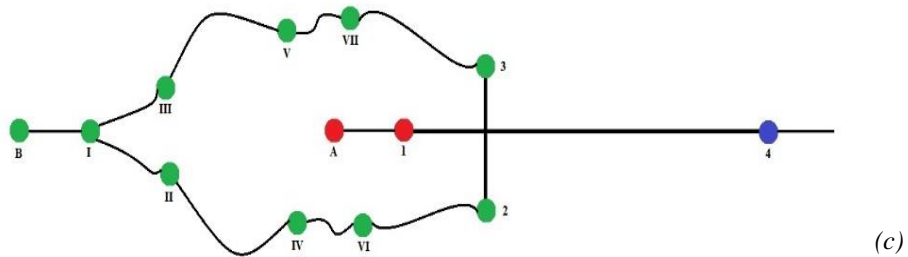
Perdita di carico $\Delta P$ [atm]	$Q_{\text{totale}}$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]
1	15
2	30
3	45
4	60
5	75

La tenuta del circuito è stata valutata non efficace nel caso in cui sono stati osservati gocciolamenti in corrispondenza delle connessioni, perdita di aggancio dei tubi di connessione e, caso peggiore, rottura del microcapillare stesso.

### 3.3.1 Prova 1

E' stato inizialmente testato un circuito caratterizzato dalla presenza di due siringhe da 2,5 mL collegate a una pompa a siringa. Una siringa è stata collegata all'ingresso centrale del microcapillare, l'altra agli ingressi laterali tramite una connessione a y. Tale sistema permette di applicare portate laterali pari alla metà della portata centrale impostata. Il circuito in esame viene montato e riempito con acqua distillata per evitare la formazione di bolle al suo interno. In Figura 3.5 viene riportato il circuito utilizzato e lo schema relativo, comprensivo delle connessioni presenti.





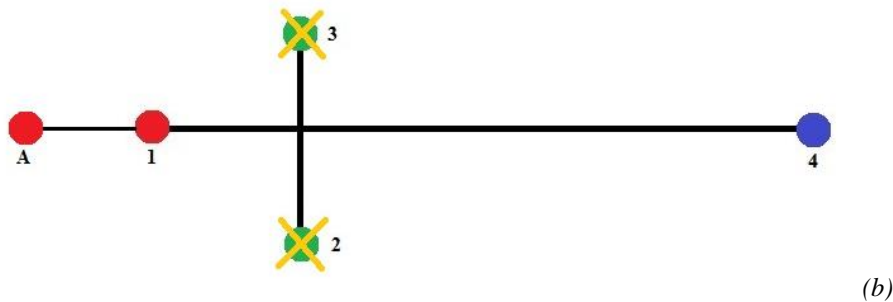
**Figura 3.5** - Circuito utilizzato (a), dettaglio della connessione a y (b) e schema del circuito con relative connessioni (c)

In Figura 3.5 (c) vengono evidenziate le connessioni presenti nel circuito in esame: le connessioni A e B riguardano l’interazione “ago siringa - tubo di connessione”, le connessioni 1, 2, 3 riguardano le interazioni “ingressi del capillare - tubo di connessione” e la connessione 4 l’interazione “uscita del capillare - tubo di connessione”. Infine, le connessioni I, II, III, IV, V, VI e VII riguardano le connessioni presenti in virtù della biforcazione a y.

### 3.3.2 Prova 2

Alla luce dei risultati ottenuti nella Prova 1 (Paragrafo 4.2.1), è stato successivamente testato il circuito di Figura 3.6, caratterizzato dalla presenza di una siringa da 2,5 mL collegata ad una pompa a siringa. Tale siringa è stata collegata al solo ingresso centrale. I due ingressi laterali, invece, sono stati esclusi tramite la connessione a tubi in silicone ostruiti tramite clamp. Tale sistema permette di studiare la tenuta del circuito in assenza del contributo fornito dagli ingressi laterali, valutando unicamente gli effetti dati dalla portata centrale. Il circuito è stato inizialmente riempito con acqua distillata per evitare la formazione di bolle al suo interno. In Figura 3.6 viene riportato inoltre lo schema relativo alla prova, comprensivo delle connessioni presenti.





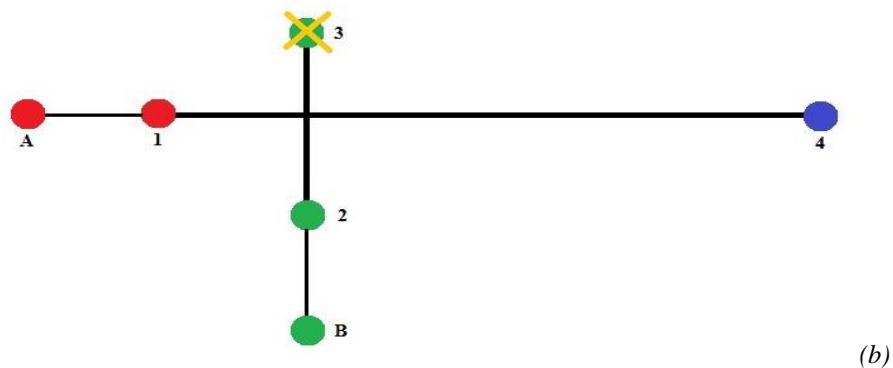
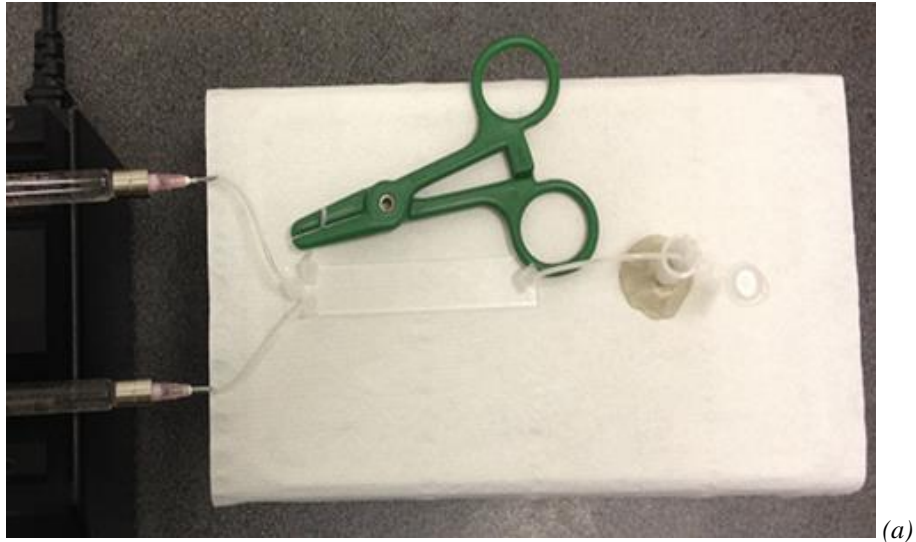
**Figura 3.6** - Circuito utilizzato (a) e schema del circuito con relative connessioni (b)

In Figura 3.6 (b) vengono evidenziate le connessioni presenti nel circuito in esame: la connessione A riguarda l’interazione “ago siringa - tubo di connessione”, la connessione 1 riguarda l’interazione “ingresso del capillare - tubo di connessione” e la connessione 4 l’interazione “uscita del capillare - tubo di connessione”. Gli ingressi in corrispondenza di 2 e 3 sono stati chiusi tramite l’ostruzione dei tubi di connessione con clamp.

### 3.3.3 Prova 3

Alla luce dei risultati ottenuti nelle prove 1 e 2 (Paragrafi 4.2.1 e 4.2.2), è stato successivamente testato il circuito di Figura 3.7, caratterizzato dalla presenza di due siringhe da 2,5 mL collegate ad una pompa a siringa. Tali siringhe sono collegate una all’ingresso centrale e l’altra a un ingresso laterale. Il terzo ingresso, invece, è stato escluso tramite la connessione a un tubo in silicone ostruito tramite clamp. La portata totale calcolata è stata equamente distribuita tra le due siringhe per l’erogazione. Il circuito è stato inizialmente

riempito con acqua distillata, in modo da evitare l'accumulo di bolle d'aria al suo interno. In Figura 3.7 viene riportato lo schema relativo alla prova, comprensivo delle connessioni presenti.

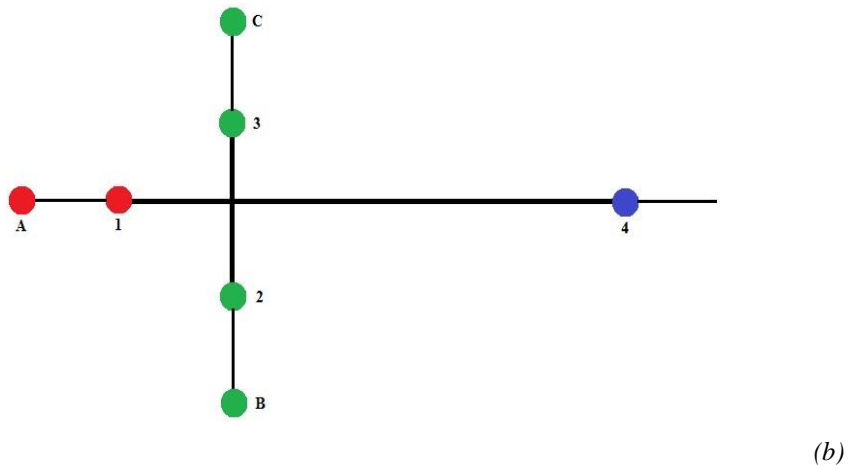
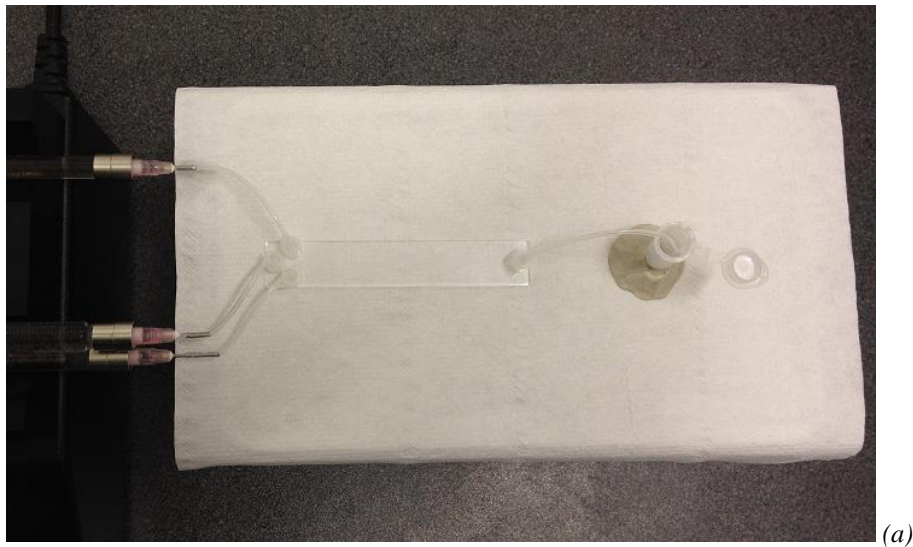


**Figura 3.7** - Circuito utilizzato (a) e schema del circuito con relative connessioni (b)

In Figura 3.7 (b) vengono evidenziate le connessioni presenti nel circuito in esame: la connessione A riguarda l'interazione "ago siringa - tubo di connessione" della prima siringa, la connessione B riguarda il sistema "ago siringa - tubo di connessione" della seconda siringa, le connessioni 1 e 2 riguardano le interazioni "ingressi del capillare - tubo di connessione" e la connessione 4 riguarda l'interazione "uscita del capillare - tubo di connessione". L'ingresso in corrispondenza di 3 è stato chiuso tramite ostruzione del tubo di connessione con clamp.

### 3.3.4 Prova 4

Alla luce dei risultati ottenuti nelle prime prove di tenuta (Paragrafi 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3), si è deciso di testare il circuito in Figura 3.8, caratterizzato dalla presenza di tre siringhe collegate alla pompa siringa e, di conseguenza, da un minor numero di connessioni a parità di ingressi rispetto al circuito della Prova 1. Il circuito è stato inizialmente riempito con acqua distillata per evitare la presenza di bolle d'aria.



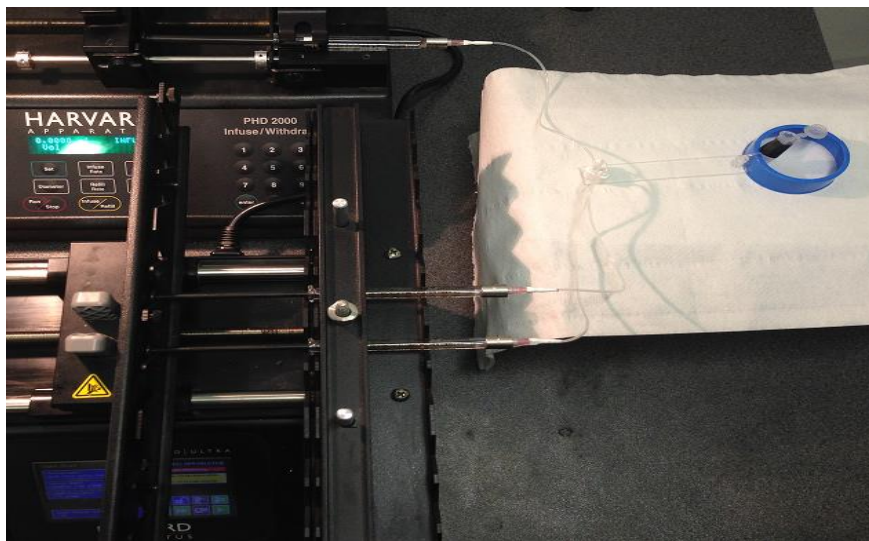
**Figura 3.8** - Circuito utilizzato (a) e schema del circuito con relative connessioni (b)

In Figura 3.8 (b) vengono evidenziate le connessioni presenti nel circuito in esame: la connessione A riguarda l'interazione "ago siringa - tubo di connessione" della prima siringa, la connessione B riguarda il sistema "ago siringa - tubo di connessione" della seconda siringa

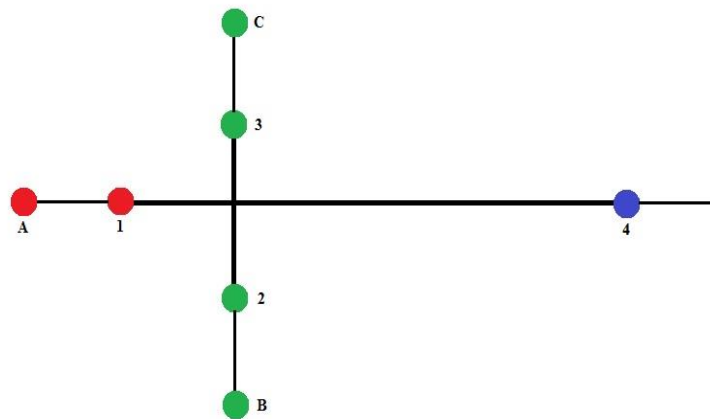
e la connessione C riguarda il sistema “ago siringa - tubo di connessione” della terza siringa. Le connessioni 1, 2 e 3 riguardano le interazioni “ingressi del capillare - tubo di connessione”. La connessione 4 riguarda l’interazione “uscita del capillare - tubo di connessione”.

### 3.3.5 Prova 5

Alla luce dei risultati ottenuti nelle precedenti prove di tenuta (Paragrafi 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3 e 4.2.4), si è deciso di testare il circuito in Figura 3.9, caratterizzato dalla presenza di tre siringhe collegate a due pompe siringa. Poiché il confinamento attuato è simmetrico, le siringhe laterali sono state montate sulla medesima pompa siringa, permettendo dunque l’erogazione di pari portate. La siringa centrale, invece, è stata posta sull’altra pompa siringa. Il circuito è stato dapprima riempito con acqua distillata per evitare la presenza di bolle d’aria al suo interno.



(a)



(b)

**Figura 3.9** - Circuito utilizzato (a) e schema del circuito con relative connessioni (b)

In Figura 3.9 (b) vengono evidenziate le connessioni presenti nel circuito in esame: la connessione A riguarda l'interazione "ago siringa - tubo di connessione" della prima siringa, la connessione B riguarda il sistema "ago siringa - tubo di connessione" della seconda siringa e la connessione C riguarda il sistema "ago siringa - tubo di connessione" della terza siringa. Le connessioni 1, 2 e 3 riguardano le interazioni "ingressi del capillare - tubo di connessione". La connessione 4 riguarda l'interazione "uscita del capillare - tubo di connessione".

### 3.4 Ottimizzazione dei parametri

La fase di ottimizzazione dei parametri di lavoro è finalizzata a determinare il miglior compromesso nell'ottenere la massima resa di incapsulamento:

- gli sforzi di taglio e i tempi di sollecitazione devono essere tali da garantire l'apertura dei pori sulla membrana e da impedire l'emolisi dei globuli rossi; studi precedenti [4] hanno mostrato come un adeguato posizionamento dei valori  $\tau - t$  sia nell'intorno della curva di Tillmann;
- il tempo in cui i pori rimangono aperti dev'essere sufficiente per garantire alla molecola di diffondere all'interno dell'eritrocita.

Tali obiettivi sono in evidente contrasto tra loro: nel primo caso si richiedono elevate portate di esercizio che garantiscano l'applicazione di adeguati sforzi di taglio, mentre nel secondo

caso si rendono preferibili portate minori in grado di assicurare un tempo sufficientemente lungo da permettere il completo processo diffusivo.

### 3.4.1 Individuazione delle massime portate centrali applicabili

Il valore ottimale delle portate da applicare nelle successive prove sperimentali è stato determinato mediante un modello Excel sulla base del seguente procedimento:

1. definizione dell'ematocrito considerato (1%, 5% o 10%);
2. definizione della percentuale di confinamento considerata (25%, 50% o 75%);
3. valutazione del volume rappresentativo occupato dalla miscela PBS-RBC, funzione della percentuale di confinamento scelta e dell'ematocrito;
4. calcolo della massima distanza di diffusione della molecola probante sulla base del modello descritto in Figura 3.3;
5. calcolo del tempo di diffusione della molecola probante, successivamente moltiplicato per un fattore di sicurezza pari a 1,5 che permette assicurare che i pori sulla membrana rimangano aperti per un tempo sufficiente a favorire l'ingresso della molecola probante:

$$t_{diff\_totale} = t_{diff} \cdot 1,5 \quad (3.20)$$

dove il fattore 1,5 tiene anche conto del fatto che l'eritrocita viene sollecitato in maniera efficace solo ad una certa distanza dagli ingressi laterali;

6. valutazione della velocità massima della miscela PBS-RBC, definita pari a:

$$v_{max} = \frac{l}{t_{diff\_totale}} \quad (3.21)$$

7. calcolo della portata massima della miscela PBS-RBC in grado di garantire un tempo di passaggio nel capillare tale da permettere il corretto processo di diffusione:

$$Q_{max} = v_{max} \cdot A_{cap\_RBC} \quad (3.22)$$

dove  $A_{cap\_RBC}$  rappresenta la sezione del capillare occupata dalla miscela PBS-RBC.

In Tabella 3.5 vengono dunque riportati i valori di portata centrale massima applicabile distinti per ematocrito e caso in esame.

**Tabella 3.5** - Portate centrali massime calcolate al fine di consentire il corretto processo di incapsulamento, distinte per ematocrito e percentuale di confinamento considerata

	Q <sub>centrale, max</sub> [ $\mu$ L/min]		
	Ht = 1%	Ht = 5%	Ht = 10%
Caso A	7,4	21,7	34,5
Caso B	14,9	43,4	68,9
Caso C	22,3	65,1	103,4

Una volta definita la portata massima relativa al flusso centrale, vengono definite le portate laterali in base alla percentuale di confinamento scelta.

### 3.4.2 Ottimizzazione dell'incapsulamento: selezione delle prove

Dopo avere individuato i valori di portata centrale massima applicabile, in grado di consentire una corretta diffusione di molecole all'interno dei pori degli eritrociti, si è studiato un criterio che permettesse di selezionare i punti di lavoro ottimali da utilizzare per le prove di incapsulamento. I parametri di cui si è tenuto conto per questa selezione sono:

- distanza (d) tra il punto di lavoro corrispondente a una determinata prova e la retta di Tillmann nel piano  $\tau - t$ ;
- perdite di carico ( $\Delta P$ ) presenti all'interno del microcanale relative a una specifica prova.

Per ciascun punto di lavoro definito nella Tabella 3.5, è stato dunque applicato il seguente criterio, schematizzato in Figura 3.10.

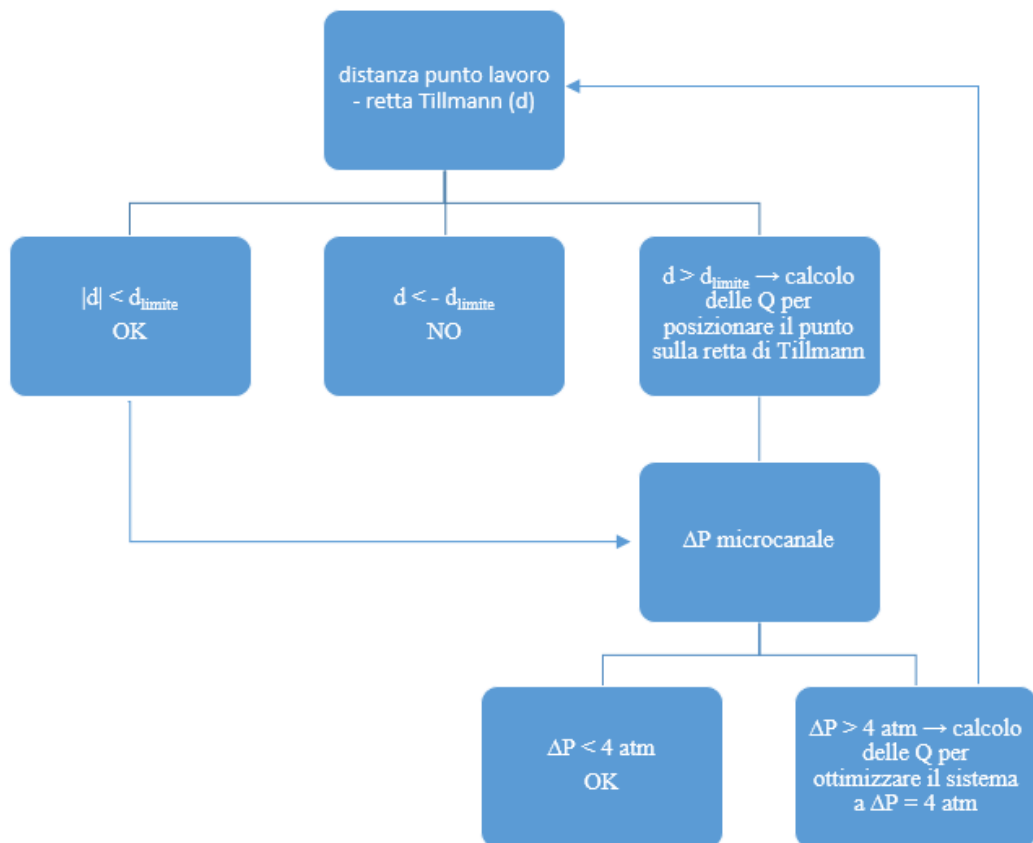


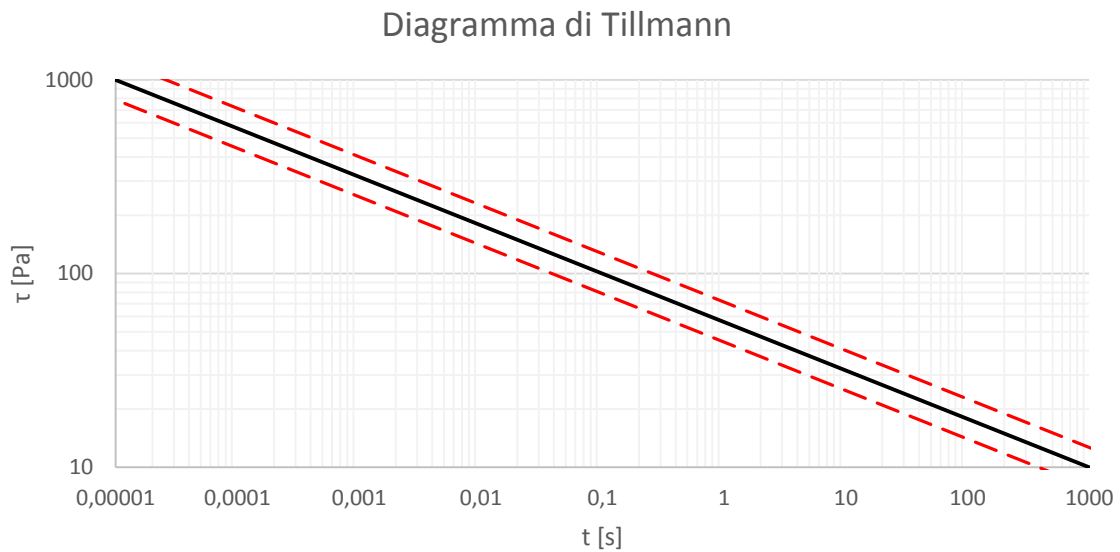
Figura 3.10 - Schema del criterio di selezione delle prove sperimentali

E' stata dapprima calcolata la distanza tra il punto di lavoro relativo alla singola prova e la retta di Tillmann. Tale distanza (d) è stata calcolata nel piano bilogarithmico  $\tau - t$  sulla base della seguente formula:

$$d = \frac{|\log y_0 - m \cdot \log x_0 - q|}{\sqrt{1 + m^2}} \quad (3.23)$$

dove  $x_0$  e  $y_0$  rappresentano le coordinate relative al generico punto  $P_0$  nel piano  $\tau - t$ ,  $m$  rappresenta il coefficiente angolare della retta di Tillmann (pari a  $-1/4$ ) e  $q$  rappresenta l'intercetta (pari a  $7/4$ ). E' stata definita una distanza massima "punto - retta" accettabile, oltre la quale è stata ritenuta non efficace l'apertura dei pori: tale distanza limite ( $d_{limite}$ ) è stata valutata pari a  $0,1 \sqrt{Pa^2 + s^2}$ , con valori positivi per punti al di sopra della retta e con valori negativi per punti al di sotto di essa (Figura 3.11).



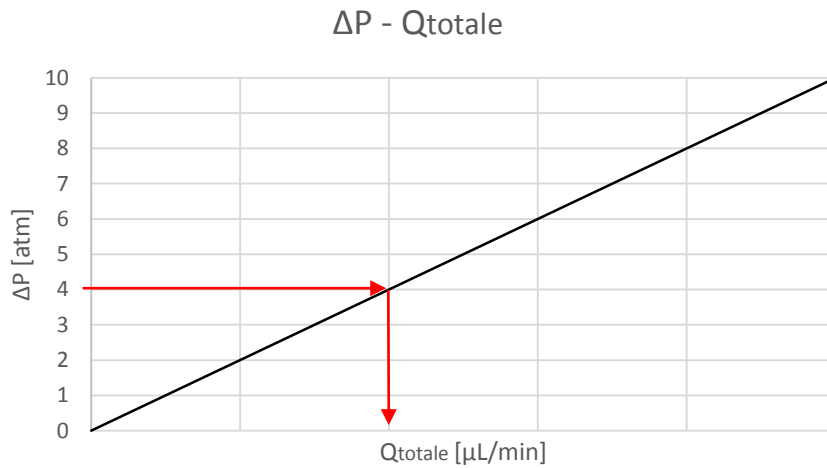


**Figura 3.11** - Diagramma di Tillmann e relativa distanza limite

Sono dunque stati definiti tre casi:

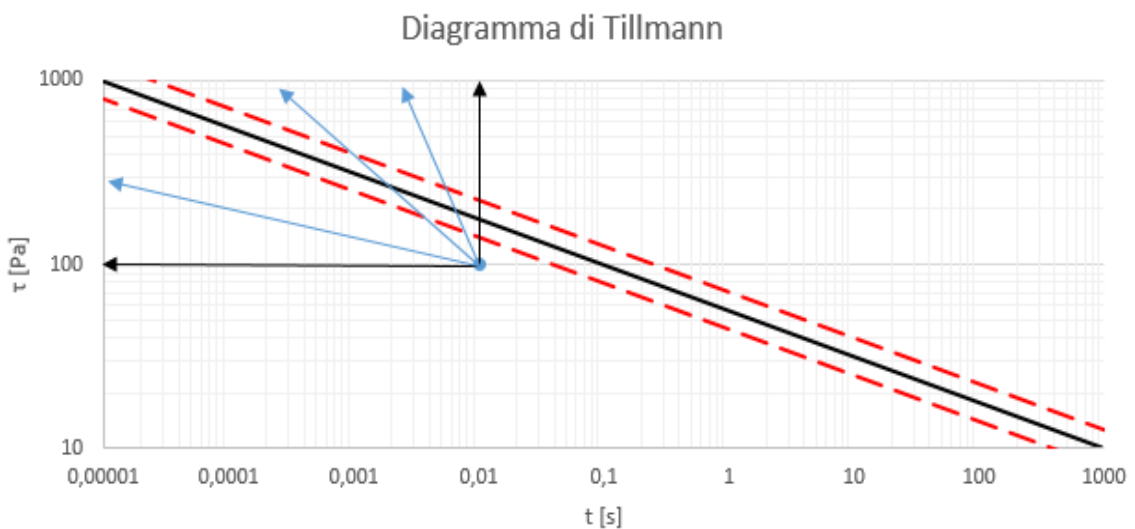
- $|d| < d_{limite}$  ;
- $d < -d_{limite}$ ;
- $d > d_{limite}$  .

Nei caso in cui il modulo della distanza è risultato minore alla distanza limite ( $|d| < d_{limite}$ ), si è scelto di verificare la perdita di carico del microcanale in corrispondenza delle portate relative alla specifica condizione di prova. Le prove di tenuta effettuate hanno definito il limite di perdite di carico accettabile, oltre il quale la tenuta del circuito non è più garantita. Tale limite ( $\Delta P_{limite}$ ) è stato definito pari a 4 atm (Paragrafo 4.2.5). E' stato dunque verificato che le perdite di carico relative al punto di lavoro selezionato non fossero superiori a 4 atm. Soddisfatti entrambi i requisiti ( $|d| < d_{limite}$  e  $\Delta P < \Delta P_{limite}$ ), si è scelto di selezionare il punto di lavoro per le prove sperimentali. Nei casi in cui, invece, il requisito relativo alle perdite di carico non fosse soddisfatto ( $\Delta P > \Delta P_{limite}$ ), è stato definito, sulla base del grafico  $\Delta P - Q_{totale}$ , ricavato per ciascuna combinazione di ematocrito e confinamento, il valore di  $Q_{totale}$  relativo ad una perdita di carico pari a  $\Delta P_{limite}$  (Figura 3.12). Ricavata la  $Q_{totale}$ , è stata ridefinita la  $Q_{centrale}$  sulla base del confinamento specifico ed è stato ricalcolato il valore della distanza  $d$  punto - retta di Tillmann. E' stato successivamente applicato iterativamente il ciclo, sino alla verifica di entrambi i requisiti.



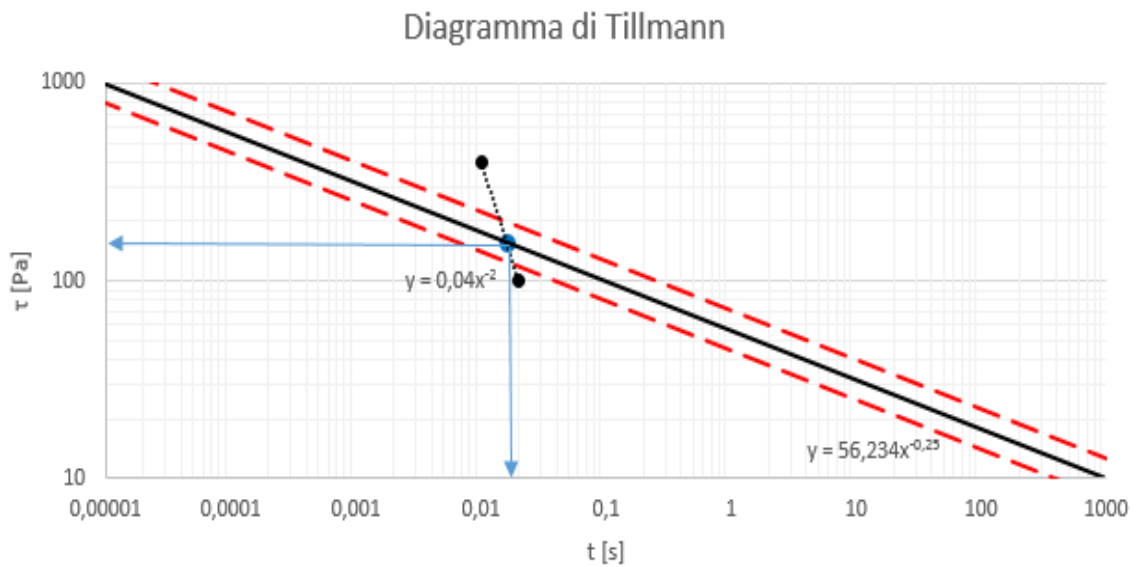
**Figura 3.12** - Grafico  $\Delta P - Q_{totale}$  e metodo per ricavare il valore della  $Q_{totale}$  corrispondente a una  $\Delta P = \Delta P_{limite}$

Nei caso in cui, invece, il valore della distanza  $d$  è risultato minore di  $-d_{limite}$  ( $d < -d_{limite}$ ), si è scelto di non effettuare alcuna prova sperimentale in corrispondenza del determinato ematocrito e della determinata percentuale di confinamento. Infatti, uno spostamento del punto all'interno della zona di accettabilità significherebbe un aumento dello sforzo di taglio e, di conseguenza, della portata, con relativa diminuzione del tempo di passaggio (Figura 3.13, frecce blu), rendendo dunque non più possibile il processo di incapsulamento della molecola probante.



**Figura 3.13** - Diagramma di Tillmann e relative traslazioni di un generico punto di lavoro all'interno della zona di accettabilità

Infine, nei casi in cui il valore della distanza è risultato maggiore della distanza limite ( $d > d_{limite}$ ), si è scelto di calcolare le coordinate  $\tau - t$  del punto di intersezione tra la retta di Tillmann e l'interpolante dei punti di lavoro relativi alle condizioni di ematocrito e percentuale di confinamento considerate (Figura 3.14). Sulla base di tali coordinate, è stato ricavato il valore della  $Q_{centrale}$  e, in base al confinamento, della  $Q_{totale}$ . E' stato successivamente verificato che, per tale  $Q_{totale}$ , venisse soddisfatto il requisito della perdita di carico. In presenza di  $\Delta P < \Delta P_{limite}$ , si è scelto di selezionare la prova per la parte sperimentale. Al contrario, ovvero nel caso in cui  $\Delta P > \Delta P_{limite}$ , è stata calcolata la  $Q_{totale}$  da applicare corrispondente a  $\Delta P = \Delta P_{limite}$  ed è stato nuovamente applicato tale ciclo iterativo.



**Figura 3.14** - Intersezione tra la curva di Tillmann e l'interpolante dei punti di lavoro corrispondenti alle condizioni di ematocrito e percentuali di confinamento considerate

### 3.5 Analisi fluidodinamica: microPIV

La Particle Image Velocimetry (PIV) è una tecnica di analisi che permette di eseguire misurazioni sperimentali su un sistema macroscopico, grazie a un sistema ottico che rileva la presenza di particelle fluorescenti all'interno di un fluido in movimento. Grazie al recente sviluppo di nuovi sistemi basati su tecnologie laser e complessi algoritmi di correlazione, si è reso possibile ridimensionare il campo di analisi a livello microscopico. Tale tecnica è utilizzata per studiare il comportamento di fluidi all'interno di dispositivi micrometrici di varie forme e dimensioni, sia *in vitro* [7-10] sia *in vivo* [11, 12].

#### 3.5.1 Principio di funzionamento

L'analisi  $\mu$ PIV si basa sulla registrazione dello spostamento di particelle fluorescenti che si muovono in maniera solidale con il fluido. Per garantire una buona riuscita dell'analisi, sono fondamentali le dimensioni delle particelle e la loro densità: esse devono essere sufficientemente piccole da evitare interferenze sul campo di moto e devono presentare densità paragonabile a quella del fluido in analisi.

Il principio consiste nel rilevare la posizione  $x$  di una particella in due istanti di tempo distanti  $\Delta t$ . Se quest'ultimo dovesse risultare sufficientemente piccolo, si può assumere che lo spostamento  $\Delta s$  sia tale per cui la velocità sia approssimabile come:

$$v \cong \frac{x_{t+\Delta t} - x_t}{\Delta t} = \frac{\Delta s}{\Delta t} \quad (3.24)$$

L'intero sistema viene investito da un fascio di luce laser, caratterizzato da una lunghezza d'onda tale da indurre la fluorescenza delle particelle traccianti. A causa della difficoltà pratica di allineare sullo stesso piano di dimensioni micrometriche sia il fascio laser sia la camera, vengono analizzati solo i dati relativi al piano di messa a fuoco del microscopio. Tale impostazione permette di ottenere risultati tanto più accurati quanto minore è la *Depth - Of - Field (DOF)* ma, allo stesso tempo, introduce il problema del rumore generato dalle particelle fuori fuoco. Quest'ultime, infatti, essendo colpite dal laser emettono una fluorescenza di fondo che provoca rumore nel segnale. Tale rumore può essere successivamente eliminato tramite *post - processing*.

L'acquisizione dei dati avviene tramite una camera *Charge - Coupled - Device (CCD)* in coppie di immagini relative a due istanti temporali distanti  $\Delta t$ . Successivamente, utilizzando algoritmi di *cross - correlazione* applicati su specifiche griglie, vengono calcolati gli spostamenti locali  $\Delta s$  e le velocità.

### 3.5.2 Apparato sperimentale

Il sistema  $\mu$ PIV utilizzato (Figura 3.15) risulta costituito da:

- un sistema laser Nd:YAG (*Neodymium - doped yttrium aluminium garnet*);
- un microscopio invertito ad epifluorescenza;
- una camera CCD per acquisire le immagini;
- un sincronizzatore per la gestione di tutti i componenti;
- un calcolatore per immagazzinare i dati.

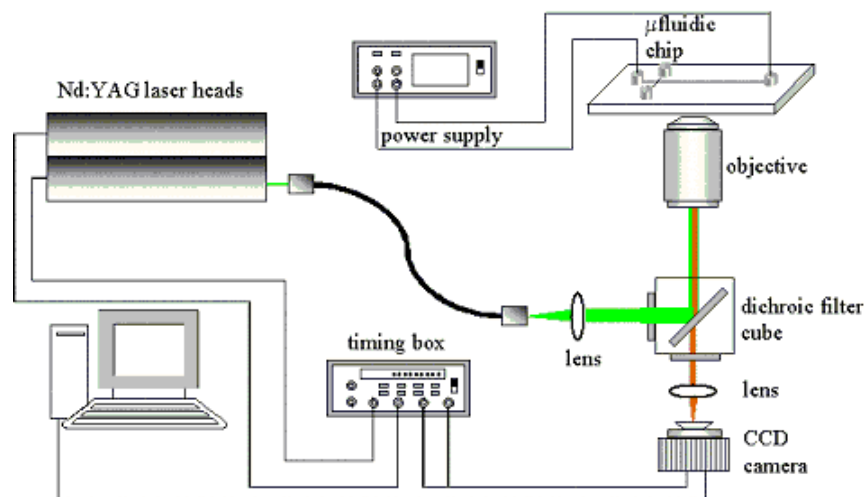
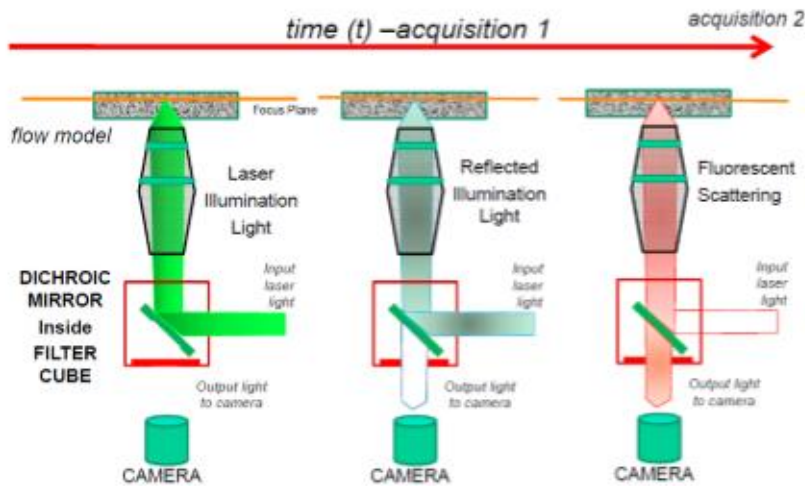


Figura 3.15 - Schema dell'apparato  $\mu$ PIV [13]

Il software INSIGHT 3G (TSI, MN, US) provvede alla gestione dell'intero sistema e fornisce l'interfaccia grafica all'utente. Il software TECPLOT (Tecplot Inc., WA, US) viene utilizzato per la visualizzazione e l'elaborazione delle immagini.

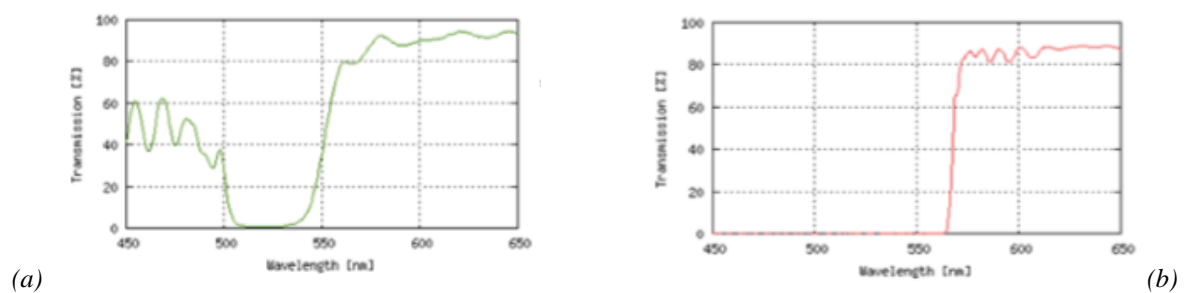
Il sistema laser è un laser ad Argon SOLO II-15 (New Wave Research, Fremont, US) che emette ad una lunghezza d'onda di 532 nm, con impulsi da 2 a 10 ns. Il sincronizzatore è un LaserPulse<sup>TM</sup> Synchronizer, modello 610034 dell'azienda TSI (MN, US).

Un elemento fondamentale è il *filter cube*, un insieme di filtri ottici che permette di ottenere una corretta riflessione e trasmissione dei raggi luminosi, come schematizzato in Figura 3.16. I due componenti principali sono lo specchio dicroico (in verde), posizionato a circa 45° rispetto alla direzione del laser, e il *barrier filter* (in rosso).



**Figura 3.16 -**  
Rappresentazione dei  
fasci luminosi presenti in  
un'analisi PIV [14]

Lo specchio dicroico si comporta da filtro passa alto, riflettendo la luce del laser verso il canale e trasmettendo la luce in fluorescenza, come si osserva dallo spettro caratteristico in Figura 3.17 (a). La luce del laser riflessa dal sito di acquisizione viene quasi totalmente deviata dallo specchio dicroico verso la sorgente. Per evitare che una parte della luce riflessa superi il filtro, raggiungendo la camera e gli oculari del microscopio, viene posizionato il *barrier filter* all'uscita del *filter cube*; la cui caratteristica è riportata in Figura 3.17 (b).

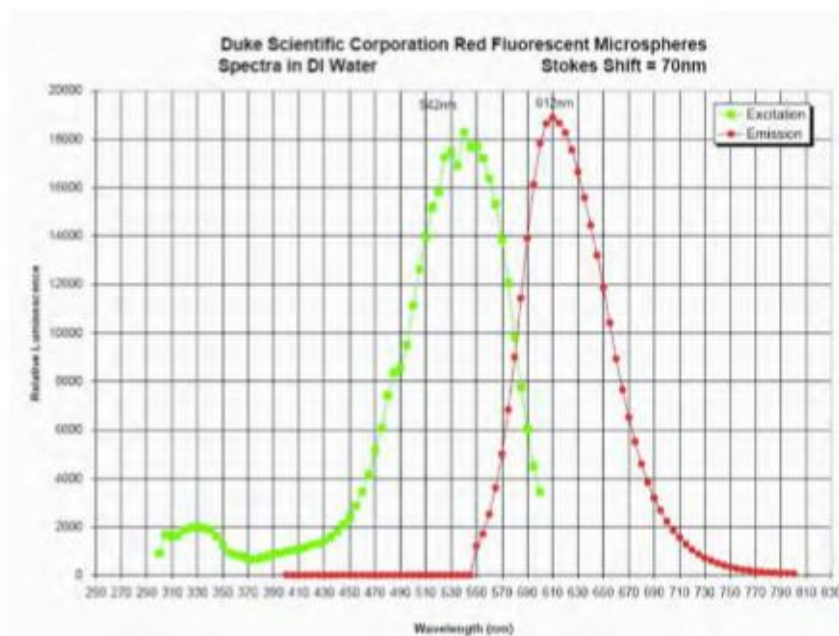


**Figura 3.17 -** Caratteristiche spettroscopiche dello specchio dicroico (a) e del barrier filter (b) presenti nel *filter cube*

Il sistema utilizza un microscopio invertito epifluorescente Olympus IX71 su cui è montato un obiettivo Olympus UPlanFLN con un ingrandimento 20X, una *Numerical Aperture* di 0,3 e una *DOF* di circa 10-15  $\mu\text{m}$ . A tal proposito, è necessario considerare gli effetti delle

particelle posizionate al di fuori del piano focale, le quali, generando fluorescenza, creano un rumore di fondo del segnale acquisito e abbassano il *Signal to Noise Ratio (SNR)*. Tali effetti sono funzione sia della profondità della sezione, in questo caso costante in quanto il capillare ha dimensioni fisse, sia della concentrazione delle particelle, che d'essere sufficiente a garantire un adeguato numero di dati da elaborare ma non in quantità eccessiva al fine di evitare di creare un rumore difficile da eliminare.

Le particelle traccianti utilizzate sono microsfele in PS (*Red Fluorescent Polystyrene microspheres*, fornite dalla Duke Scientific Corporation) con una densità di  $1,05 \text{ g/cm}^3$ , in soluzione acquosa allo 0,1% in massa. Il diametro medio delle particelle è pari a  $1 \mu\text{m}$ , dunque sufficientemente piccolo per essere trascinate dal fluido senza influenzarne il moto ma sufficientemente grande da generare una fluorescenza rilevabile dal sensore CCD. In Figura 3.18 si osserva come lo spettro di eccitazione ed emissione risponda ai requisiti del sistema utilizzato: il picco di eccitazione si trova a una lunghezza d'onda pari a 542 nm mentre il picco di emissione si trova a 612 nm. Il primo è sufficientemente vicino ai 532 nm del laser, il secondo presenta una lunghezza d'onda superiore rispetto alla frequenza di taglio del *filter cube*.



**Figura 3.18** - Caratteristica spettroscopica delle particelle traccianti

La camera è una POWER VIEW Plus 4M (modello 630059 della TSI) e le sue caratteristiche principali sono le seguenti:

- Pixel Size: 7,4  $\mu\text{m}$  x 7,4  $\mu\text{m}$ ;
- Number of Pixel: 2048 x 2048;
- Active Area: 15,16 mm x 15,16 mm;
- Dynamic Range: 12 bit (4096 livelli di grigi).

La combinazione della camera con un'ottica del microscopio di 20X e lenti di proiezione da 1X portano ad un campo di vista (*Field of view*) complessivo di 0,76 mm x 0,76 mm, in cui ogni pixel misura 0,23  $\mu\text{m}$  x 0,23  $\mu\text{m}$ .

### 3.5.3 Acquisizione delle immagini

Il procedimento di acquisizione delle immagini è controllato dal sincronizzatore, il quale:

- regola il sensore CCD, che inizia l'acquisizione, e segnala al sincronizzatore che lo *shutter* è aperto;
- triggera il laser che invia il primo impulso;
- triggera il laser per il secondo impulso a una distanza temporale  $\Delta t$  stabilita.

In seguito, il sensore CCD chiude lo *shutter* terminando l'acquisizione e manda l'immagine al calcolatore per la memorizzazione. L'efficacia della misura è influenzata da parametri e da tempi che dipendono a loro volta dal caso specifico in esame.

I parametri d'acquisizione vengono impostati tramite il *software* INSIGHT 3G nella sezione Capture. In particolare, in Figura 3.19, si valutano:

- PIV frame mode: numero di immagini che vengono catturate quando il sensore CCD riceve l'impulso dal sincronizzatore. È possibile lavorare in modalità Single o Stradle, ottenendo rispettivamente un solo frame o una coppia di immagini;
- Pulse Rep Delay [Hz]: frequenza di ripetizione tra una sequenza di impulsi e un'altra;
- Laser Pulse Delay [ $\mu\text{s}$ ]: tempo di attesa prima che venga emesso il primo impulso del laser;
- $\Delta t$  [ $\mu\text{s}$ ]: intervallo di tempo tra i due impulsi del laser. Corrisponde al  $\Delta t$  tra le due immagini e va impostato in base allo specifico problema, in quanto stabilisce un limite teorico nella massima velocità rilevabile;



- PIV exposure: tempo di apertura della camera in cui è contenuto il sensore CCD.

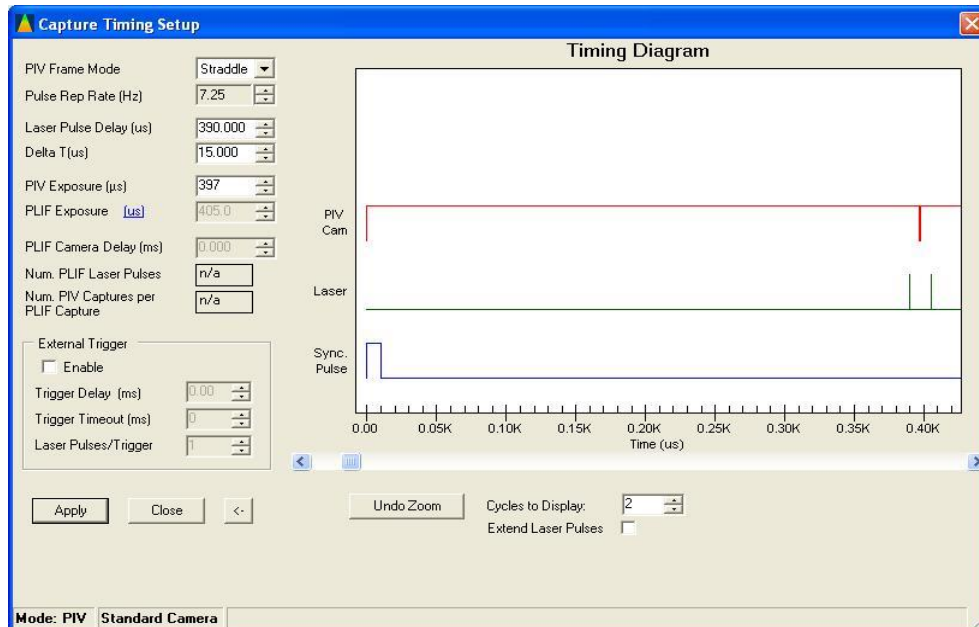


Figura 3.19 - Schermata di controllo dei parametri che controllano l'acquisizione PIV

### 3.5.4 Post - processing dei dati: 2 - Frame Cross - Correlation

Le coppie di immagini, ognuna ottenuta con un singolo impulso del laser, vengono analizzate con tecniche di cross - correlazione statistica, permettendo di calcolare lo spostamento locale e la velocità. La scelta dei tempi di lavoro e le caratteristiche del sistema determinano il *range* di misure ottenibili: la massima velocità rilevabile è influenzata dal tempo che intercorre tra le due esposizioni alla luce laser mentre la frequenza di campionamento delle coppie è limitata dalla velocità di registrazione della camera e di trasferimento dell'immagine al computer.

Su ogni immagine viene creata una mesh che delimita delle zone (*interrogation area*) su cui applicare l'algoritmo. Al fine di ottenere soluzioni affidabili, in ogni esperimento sono stati definiti i seguenti requisiti [15]:

- l'*interrogation area* deve avere un'estensione sufficientemente piccola da permettere a un vettore di descrivere la velocità del flusso in quell'area;

- in ogni *interrogation area* devono essere presenti almeno 10 particelle;
- lo spostamento massimo tra le *interrogation area* del primo *frame* rispetto a quello del secondo dev'essere pari al 25% dello *spot*;
- il massimo spostamento tra i due *frame* in senso ortogonale rispetto al piano focale dev'essere pari al 25% dello *spot*;
- lo spostamento di ogni particella dev'essere almeno pari al doppio del diametro medio delle particelle;
- il tempo di esposizione deve permettere di distinguere chiaramente ogni singola particella.

Spostamenti maggiori della metà dell'*interrogation area* portano a risultati errati nel processo di autocorrelazione in quanto il picco tende a spostarsi verso il centro. Al fine di risolvere questo problema intrinseco nel metodo, vengono sovrapposte del 50% le aree adiacenti nelle due direzioni x e y.

L'algoritmo considera tutti gli spostamenti possibili delle particelle e ne somma le probabilità che si verifichino. In formule, la funzione di cross - correlazione  $\Phi$  per un dato spostamento può essere espressa come:

$$\Phi(x, y) = \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^M f(i, j) \cdot g(i + x, j + y) \quad (3.25)$$

dove  $f(i, j)$  e  $g(i, j)$  sono la distribuzione dei livelli di grigi delle due immagini e  $N \times M$  è la dimensione in pixel dell'*interrogation area*.

Viene in seguito creata una mappa di cross-correlazione (Figura 3.20), con un picco principale che indica lo spostamento  $\Delta s = (x, y)$  più probabile e altri picchi di entità minore dovuti al rumore di fondo e/o a una scarsa corrispondenza tra le immagini.

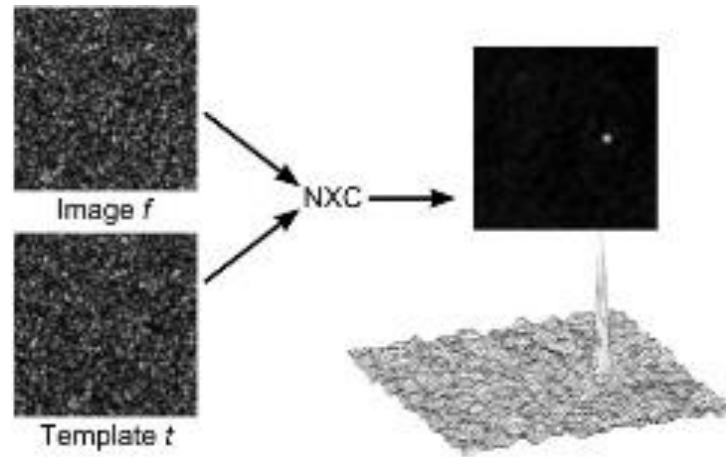


Figura 3.20 - Mappa di cross - correlazione normalizzata (NXC) per un singolo step [16]

Al fine di aumentare l'affidabilità del risultato si utilizza, in caso di flusso stazionario, la *ensemble technique* (schematizzata in Figura 3.21). Tale tecnica applica il medesimo algoritmo a più coppie di immagini, in modo da mediare le mappe di correlazione nel caso in cui sia insufficiente il numero di particelle in ogni *interrogation area*. In formula:

$$\Phi_{media}(x, y) = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^n \Phi_k(x, y) \quad (3.26)$$

Dove  $\Phi_k$  è la k-esima coppia di immagini e n il numero totale di registrazioni effettuate.

Aumentando il numero di immagini processate, si osserva che il picco principale diventa sempre più evidente e che il rumore, di natura aleatoria, viene progressivamente eliminato. È inoltre possibile diminuire la grandezza dello spot al fine di avere una risoluzione migliore, specialmente nel caso di elevati gradienti di velocità, avendo un numero maggiore di dati relativi alla stessa area.

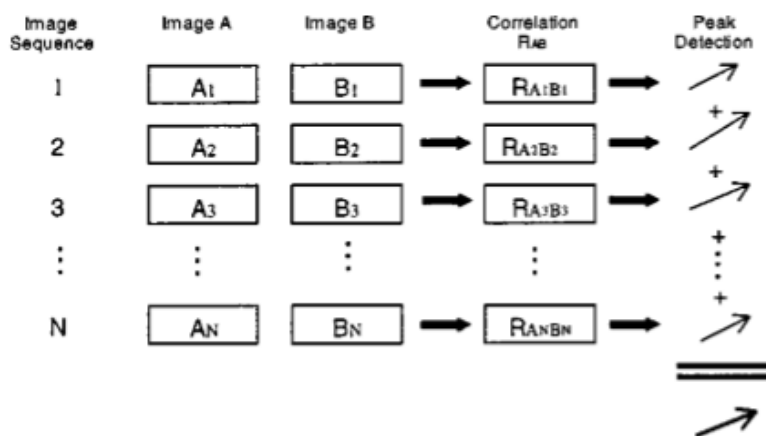


Figura 3.21 - Rappresentazione schematica dell'ensemble technique [15]

È possibile affiancare a questa tecnica un algoritmo ricorsivo che ripete il procedimento visto finora per un minimo di due volte. I dati ottenuti da un primo *processing* vengono usati come riferimento per settare gli *offset* della griglia per il secondo *processing*. In tal modo è possibile ridurre la dimensione di ciascun *interrogation area* senza aumentare la concentrazione delle particelle traccianti, ottenendo allo stesso tempo un numero maggiore di vettori.

### 3.5.5 Pre - processing e post - processing

Nel caso di immagini con un SNR eccessivamente basso, è possibile eliminare il rumore di fondo con una fase di elaborazione di immagini prima del *processing* vero e proprio. Il software permette di creare, per ogni coppia di immagini, un *background* comune che comprende tutte le particelle ferme e quelle fuori fuoco. Tale immagine viene poi sottratta dalle prime due in modo da aumentare il contrasto e la correlazione.

L'ultimo passaggio consiste nella validazione del campo vettoriale ottenuta dall'analisi alla  $\mu$ PIV: si ricorda infatti che un picco è valido nell'operazione di *processing* solo se supera una soglia, variabile a seconda dell'esperimento effettuato. È necessario dunque valutare se i risultati ottenuti sono fisicamente accettabili, confrontando ogni vettore con quelli che lo circondano. Se il vettore in analisi supera la soglia di tolleranza stabilita per la validazione, questo viene rimosso e eventualmente sostituito dal sistema interpolando i vettori adiacenti.

### 3.6 Protocollo di prova: validazione del modello computazionale

In questo paragrafo viene descritto il protocollo sperimentale seguito per effettuare le prove di validazione del modello computazionale con  $\mu$ -PIV.

#### 3.6.1 Preparazione della soluzione

La soluzione utilizzata per le prove di validazione del modello computazionale risulta essere costituita da eritrociti, PBS e particelle traccianti di polistirene.

I globuli rossi sono stati ricavati da campioni di sangue bovino proveniente da macello, fornito in contenitori dal volume di 0,5 L. Tale quantità è stata successivamente filtrata, tramite apposita garza, al fine di eliminare grumi e accumuli indesiderati.

Sono state preparate 3 provette, ciascuna da 10 mL, sottoposte poi a centrifugazione per 10 minuti a 6000 giri/min. Tramite l'utilizzo di micropipettatore è stato rimosso il surnatante, lasciando dunque sul fondo della provetta il concentrato eritrocitario. Successivamente, a ciascuna provetta sono stati aggiunti 3 mL di soluzione di PBS in concentrazione 1M. Le soluzioni così ottenute sono state risottoposte a centrifugazione per 15 minuti a 6000 giri/min. Terminata la centrifugazione, da ciascuna provetta sono stati prelevati 2,5 mL di globuli rossi, uniti fino a creare una quantità totale di RBC pari a 7,5 mL. Tale quantità è stata infine diluita in 92,5 mL di soluzione di PBS 1M, ottenendo così un ematocrito pari al 7,5%. La composizione della soluzione ottenuta (soluzione A) è descritta in Tabella 3.6.

*Tabella 3.6 - Composizione della soluzione iniziale di RBC-PBS (soluzione A)*

Ht	V <sub>RBC</sub> [mL]	V <sub>PBS</sub> [mL]	V <sub>TOT</sub> [mL]
7,5%	7,5	92,5	100

Successivamente, è stata creata una seconda soluzione (soluzione B) costituita da 500  $\mu$ L di soluzione A uniti a 2 mL di soluzione di PBS 1M, ottenendo così un ematocrito pari all'1,5%. La composizione della soluzione ottenuta (soluzione B) è descritta in Tabella 3.7.

**Tabella 3.7** - Composizione della soluzione secondaria di RBC-PBS (soluzione B)

Ht	V <sub>RBC</sub> [mL]	V <sub>PBS</sub> [mL]	V <sub>TOT</sub> [mL]
1,5%	0,0375	2,4625	2,5

Sono state infine preparate le soluzioni da utilizzare per le prove di validazione alla  $\mu$ PIV. La soluzione A è stata utilizzata per preparare la soluzione finale ad ematocrito 5%; la soluzione B, invece, per preparare la soluzione finale ad ematocrito 1%. Le composizioni delle soluzioni ottenute, caratterizzate dalla presenza di RBC-PBS e di particelle traccianti in polistirene, presenti in soluzione con acqua distillata in rapporto 1:1000, sono descritte in Tabella 3.8:

**Tabella 3.8** - Composizione delle soluzioni di RBC-PBS-PS in funzione dell'ematocrito

Ht	V <sub>RBC</sub> [ $\mu$ L]	V <sub>PBS</sub> [ $\mu$ L]	V <sub>PS</sub> [ $\mu$ L]	V <sub>TOT</sub> [ $\mu$ L]
5%	45	555	300	900
1%	12	788	400	1200

### 3.6.2 Svolgimento delle prove

Le prove selezionate per la validazione del modello computazionale sono riportate in Tabella 3.9:

**Tabella 3.9** - Prove selezionate per la validazione del modello computazionale

Nome prova	Ht	% confinamento	Q <sub>centrale</sub> - Q <sub>sx</sub> - Q <sub>dx</sub> [ $\mu$ L/min]
Prova $\alpha$	5%	50%	10 - 5 - 5
Prova $\beta$	1%	25%	6 - 9 - 9
Prova $\gamma$	1%	50%	10 - 5 - 5
Prova $\delta$	1%	75%	14 - 2,3 - 2,3

Inizialmente sono stati impostati i parametri di acquisizione attraverso la sezione *capture* del software INSIGHT 3G, come riportato in Tabella 3.10.

*Tabella 3.10 - Parametri utilizzati nella prova di  $\mu$ PIV*

<b>PIV Frame Mode</b>	Straddle
<b>Pulse Rep Rate [Hz]</b>	7,25
<b>Laser Pulse Delay [<math>\mu</math>s]</b>	390
<b><math>\Delta t</math> [<math>\mu</math>s]</b>	15
<b>PIV Exposure [<math>\mu</math>s]</b>	397

Il parametro  $\Delta t$ , nello specifico, è stato scelto in base alle condizioni specifiche della prova: geometria del capillare, portata del fluido e caratteristiche degli strumenti.

Al fine di ottenere risultati affidabili è necessario che lo spostamento delle particelle tra le due immagini della stessa coppia sia pari a circa 4 pixel. Note le specifiche della telecamera e le ottiche interposte, è stato calcolato un fattore di conversione pari a 0,23  $\mu$ m/pixel nel caso in cui l'ingrandimento utilizzato sia il 20x; di conseguenza, i 4 pixel corrispondono a uno spostamento di 0,92  $\mu$ m. Sulla base delle velocità medie del fluido centrale, ricavate dalle simulazioni computazionali, è stato calcolato il tempo necessario alle particelle per compiere lo spostamento di 0,92  $\mu$ m. In Tabella 3.11 vengono portati i valori di riferimento del parametro  $\Delta t$  al variare delle prove effettuate:

*Tabella 3.11 - Valori di riferimento per il parametro  $\Delta t$  per le diverse prove di validazione*

<b>Prova <math>\alpha</math></b>	$\Delta t = 6,13 \mu$ s
<b>Prova <math>\beta</math></b>	$\Delta t = 4,62 \mu$ s
<b>Prova <math>\gamma</math></b>	$\Delta t = 6,13 \mu$ s
<b>Prova <math>\delta</math></b>	$\Delta t = 6,87 \mu$ s

Le specifiche della telecamera, con un'esposizione così breve, non permettono però di catturare immagini sufficientemente nitide. Inoltre, la fluorescenza delle particelle presenti non è sufficientemente forte da essere catturata in un tempo così breve. Si è scelto, dunque, di utilizzare il parametro  $\Delta t$  presente nella Tabella 3.10.

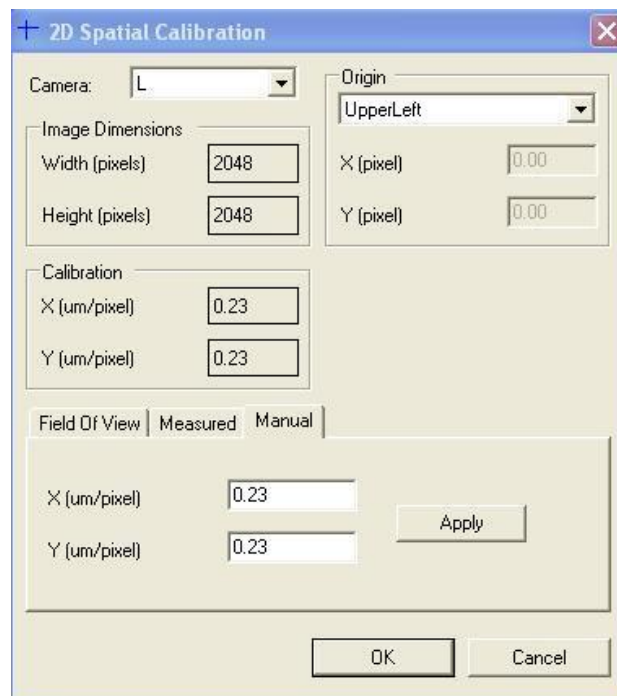
È stato necessario mettere a fuoco correttamente la porzione del canale interessata dal flusso di RBC, PBS e particelle traccianti. La *Depth-Of-Field* (DOF) del microscopio è pari a 15  $\mu$ m, circa 1/3 dello spessore totale del capillare. È dunque evidente che i risultati ottenuti per le prove saranno influenzati sia dall'effetto delle particelle fuori fuoco sia da quelle che,

anche se a fuoco, si muovono più lentamente. I globuli rossi presenti nel flusso centrale, inoltre, non sono fluorescenti e costituiscono un ingombro per le particelle traccianti; di conseguenza, il numero di particelle traccianti in ogni immagine risulta scarso, inficiando così l'affidabilità dei risultati ottenuti dall'algoritmo. Questo problema viene risolto, almeno in parte, dall'acquisizione di 150 coppie di immagini, che permette di avere una quantità di dati maggiore da elaborare. Le coppie di immagini acquisite vengono poi elaborate utilizzando il software INSIGHT 3G (TSI, MN, US).

### 3.6.3 Elaborazione dei dati

#### 3.6.3.1 Calibrazione e maschera

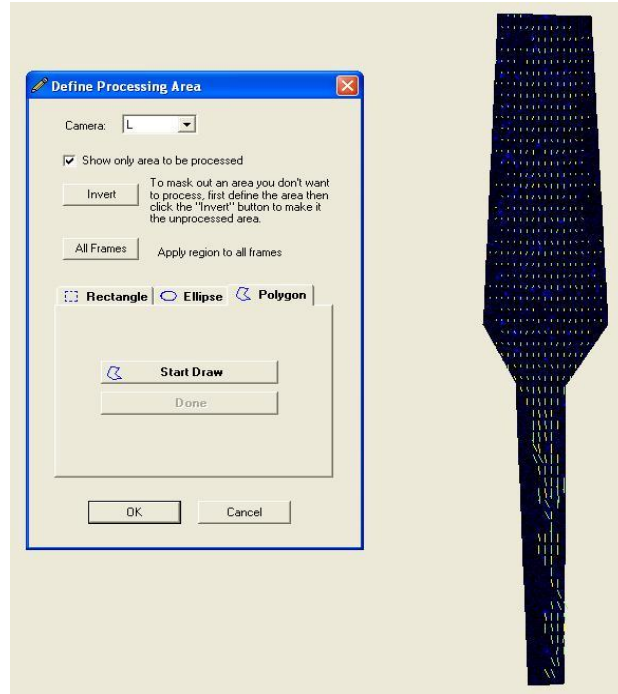
È stata inizialmente effettuata l'operazione di calibrazione (Figura 3.22), attraverso la quale è stato impostato il fattore di conversione necessario al software per convertire i pixel nell'unità di misura dello spostamento propria del Sistema Internazionale di misura. Per l'ingrandimento utilizzato, pari a 20x, si utilizza una calibrazione di 0,23  $\mu\text{m}/\text{px}$ .



**Figura 3.22** - Parametri di calibrazione per l'analisi in  $\mu\text{PIV}$ , per un ingrandimento 20x



Successivamente è stata definita una maschera (Figura 3.23), ovvero la zona dell'immagine sulla quale l'algoritmo effettuerà l'analisi, evitando quelle zone dell'immagine in cui sono assenti le particelle traccianti.



*Figura 3.23 - Maschera usata per l'analisi in  $\mu$ PIV*

### 3.6.3.2 Processing

L'algoritmo utilizzato per il processing dei dati è Ensemble PIV, applicato su tutte le 150 coppie di immagini. In Figura 3.24 vengono mostrati i parametri impostati.

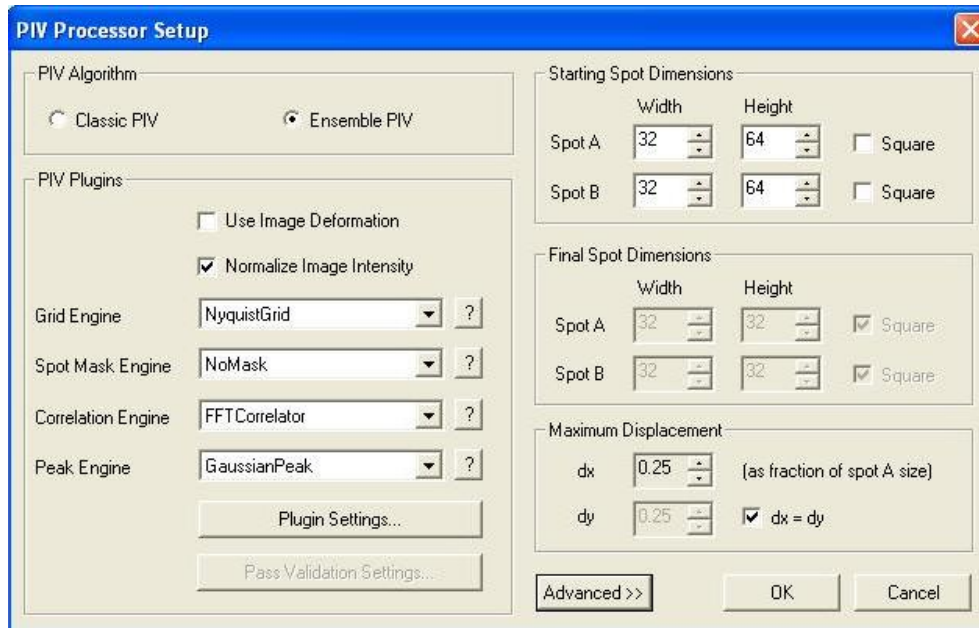


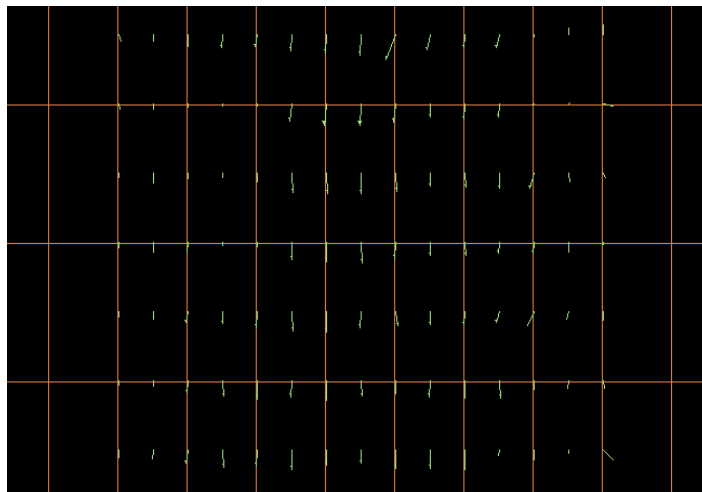
Figura 3.24 - Parametri usati nella fase di processing nell'analisi di  $\mu$ PIV

In particolare:

- Grid Engine: parametro che permette di selezionare la griglia di calcolo sulla quale si desidera applicare l'algoritmo. La griglia scelta per l'analisi  $\mu$ PIV è la Nyquist Grid: le *interrogation area* sono sovrapposte al 50% nelle direzioni x e y e i vettori vengono posizionati al centro di ogni area;
- Spot Mask Engine: parametro che consente di modificare ogni area assegnando diversi pesi alle zone. Nel caso in esame, ciascun'immagine è abbastanza povera di *spot*, perciò si è deciso di non dare rilevanza a posizioni particolari;
- Correlation Engine: parametro che calcola la funzione di correlazione tra la coppia di immagini per ogni *interrogation area* e la restituisce sulla mappa. Si è scelto di utilizzare la *Fast Fourier Transform* (FFT);
- Peak Engine: parametro che individua il picco della mappa di correlazione tramite una funzione gaussiana tra il picco massimo e i 4 più vicini, sulla base della seguente equazione:

$$dx = x + \frac{\log(l) - \log(r)}{2 \cdot (\log(l) - \log(r) - 2 \cdot \log(c))} - x_0 \quad (3.27)$$

dove  $l$ ,  $r$  e  $c$  sono i valori di intensità per i pixel a destra, sinistra e nel picco. Successivamente vengono impostate le dimensioni di ogni *interrogation area*: essendo il flusso sviluppato in una direzione principale, la griglia risulta composta da rettangoli (Figura 3.25). Le dimensioni scelte sono state ottimizzate al fine di ottenere un numero sufficiente di vettori con un valore paragonabile ai risultati ottenuti dalle simulazioni computazionali: 32 x 64 pixel ognuno sia per il frame A sia per il B. Il maximum displacement viene impostato al 25% (come da default). Sono state scelte *interrogation area* così grandi da compensare la problematica del basso  $\Delta t$ . Se una particella ha uno spostamento maggiore rispetto a quello ottimale, allargando la regione di analisi la funzione di correlazione può cercare anche particelle più lontane, permettendo di individuarle anche in presenza di spostamenti superiori rispetto a quelli attesi.



**Figura 3.25** - Zoom della griglia con i relativi vettori calcolati su ogni *interrogation area*

### 3.6.3.3 Visualizzazione dei dati

Il *software* INSIGHT 3G restituisce i dati sotto forma di tabella numerica contenente le posizioni in  $x$  e  $y$  espresse in mm, le velocità nelle due direzioni espresse in m/s e il coefficiente *Vector Choice Code* (CHC) che dà indicazioni sull'accessibilità del valore. In particolare questo coefficiente è positivo se lo spostamento corrisponde a un picco sulla mappa di correlazione (1 per il picco principale, 2 per il secondo e così via) ed è negativo se

il vettore è stato rimosso in quanto non valido. Dalla tabella ottenuta viene successivamente ricavato il profilo di velocità.

Per la Prova  $\delta$ , caratterizzata da immagini che presentano un maggior numero di particelle traccianti (cfr. Paragrafo 4.4.4) è stata ricavata l'equazione del profilo di velocità tramite Excel riportando in un grafico i valori di velocità in funzione della posizione  $y$  (perpendicolare alla direzione del flusso). Successivamente, sono state create delle linee di tendenza polinomiali fino ad ottenere un buon *fitting*. In particolare, è stato utilizzato un polinomio del secondo grado per poter riprodurre e confrontare l'andamento parabolico ottenuto dalle simulazioni computazionali. Infine, derivando le equazioni in  $dx$ , sono stati ottenuti i valori di *shear rate* da inserire nell'equazione di Casson per ricavare gli sforzi di taglio.

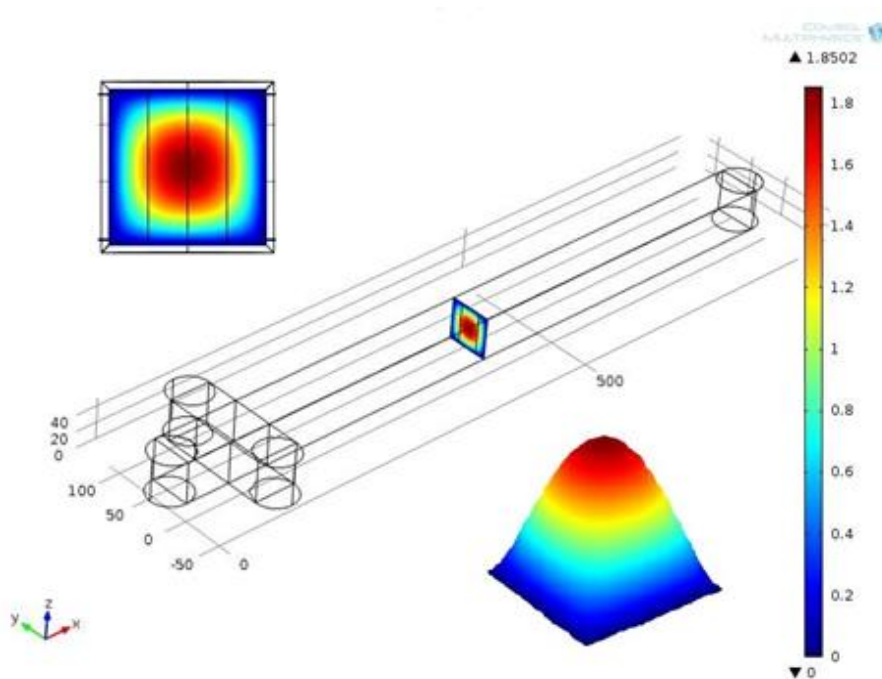
## 4 - RISULTATI

### 4.1 Risultati del modello computazionale

Nel seguente paragrafo vengono descritti i principali risultati ottenuti dal modello computazionale, focalizzando l'attenzione su quei parametri ritenuti più significativi ai fini delle successive prove sperimentali.

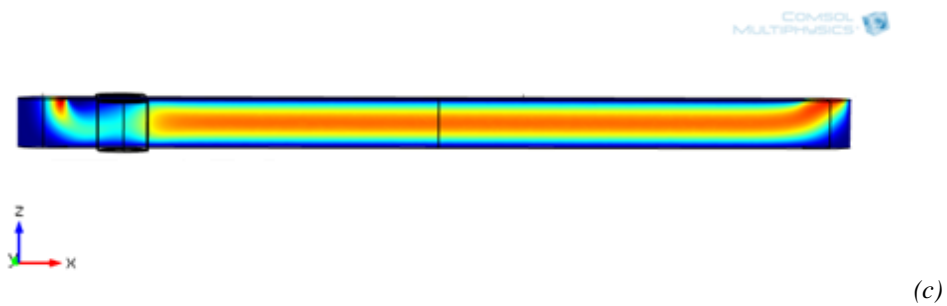
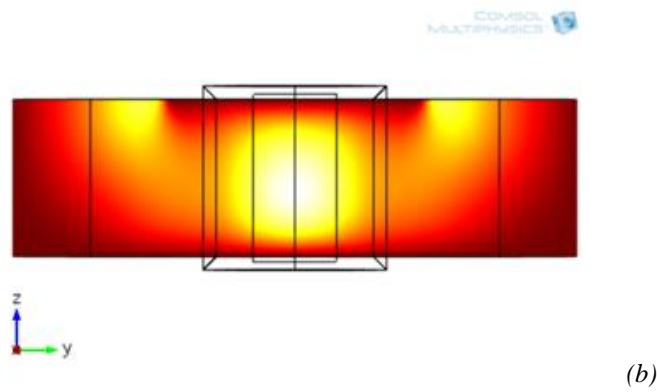
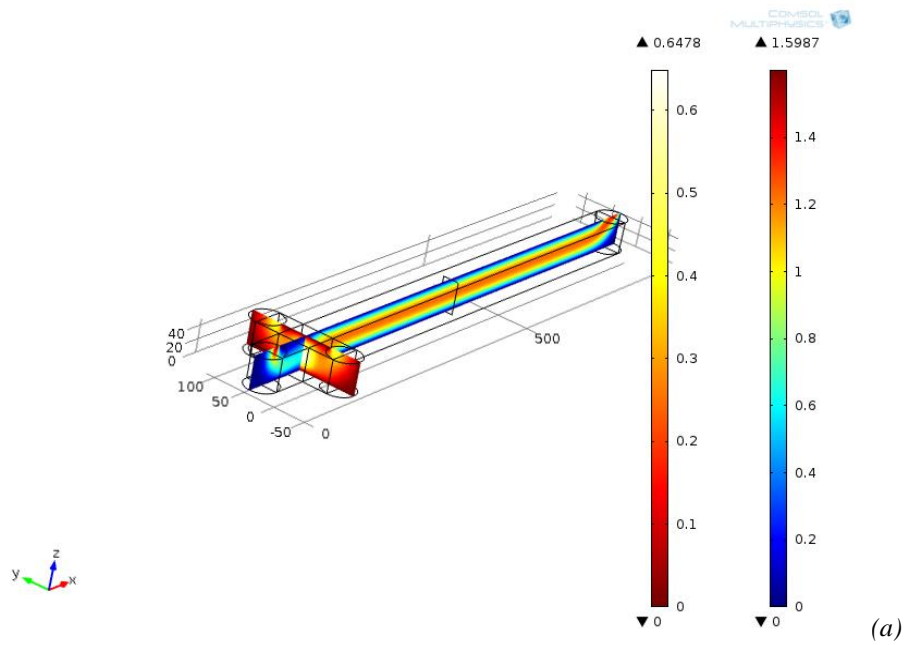
#### 4.1.1 Profilo di velocità

I profili di velocità sono stati ottenuti dal “*Laminar Flow Model*”, modello che permette di utilizzare in ingresso direttamente la portata massica e non un profilo piatto di velocità come nel *Mixture Model*. In Figura 4.1 viene riportato il profilo di velocità ricavato a livello della sezione centrale del microcanale.



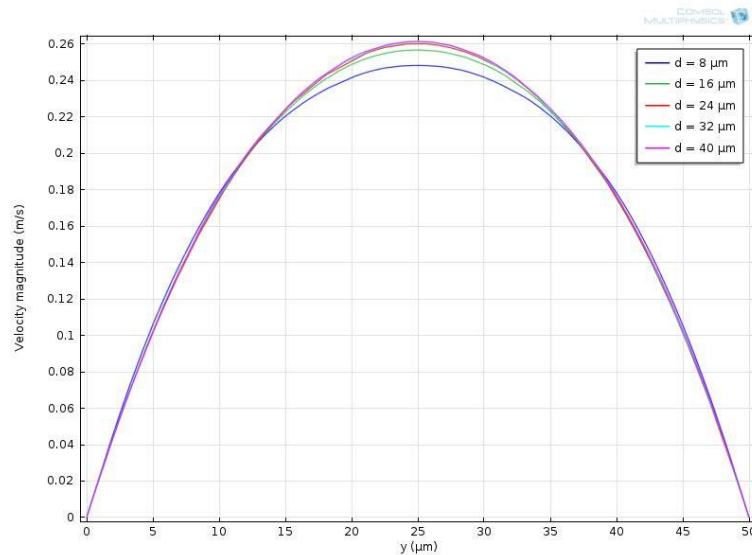
**Figura 4.1** - Profilo di velocità (m/s) relativo ad una simulazione ad ematocrito pari al 10% e ad un confinamento pari al 50% ( $Q_{centrale} = 66 \mu\text{L}/\text{min}$  e  $Q_{laterali} = 33 \mu\text{L}/\text{min}$ )

In Figura 4.2 (a), invece, vengono riportati i profili di velocità presi sui piani longitudinali alla direzione del flusso (piano zy per i flussi laterali e il piano zx per il flusso centrale). In Figura 4.2 (b) e 4.2 (c) vengono riportati, nel dettaglio, i profili per ciascun piano.



**Figura 4.2** - Profili di velocità (m/s) sui piani  $z-x$  e  $z-y$  relativo ad una simulazione ad ematocrito pari al 10% e ad un confinamento pari al 50% ( $Q_{centrale} = 44 \mu\text{L}/\text{min}$  e  $Q_{laterali} = 22 \mu\text{L}/\text{min}$ ) (a); dettaglio relativo al piano  $zy$  (b); dettaglio relativo al piano  $zx$  (c)

In Figura 4.3 viene riportato il grafico relativo al profilo di velocità calcolato all'aumentare della distanza  $d$  dall'imbocco post-ingressi laterali, sino ad arrivare ad una distanza superiore al valore dell'*Entry Length* (cfr. Paragrafo 3.1.1.1).



**Figura 4.3** - Profili di velocità lungo  $z$  in funzione della distanza dagli ingressi laterali ( $d = 0 \mu\text{m}$ ) relativo ad una simulazione ad ematocrito pari all'1% e ad un confinamento pari al 75% ( $Q_{\text{centrale}} = 14 \mu\text{L}/\text{min}$  e  $Q_{\text{laterali}} = 2,3 \mu\text{L}/\text{min}$ )

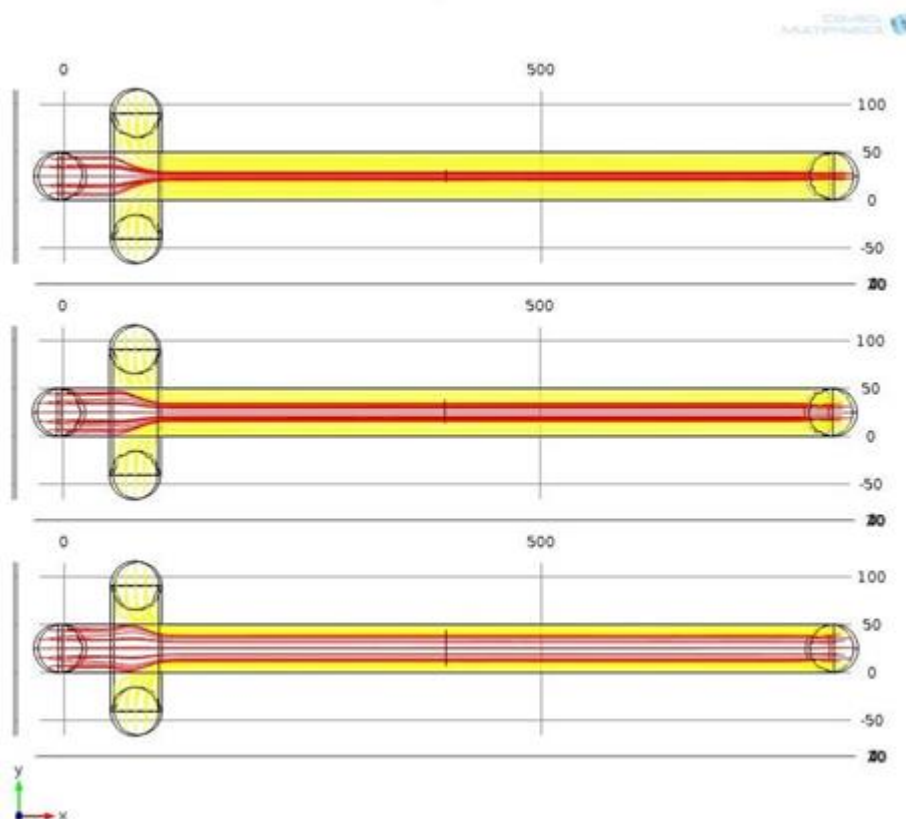
Al fine di verificare il mantenimento della laminarità al variare delle portate considerate, delle loro distribuzioni tra i tre canali eroganti e quindi dell'entità del confinamento desiderato è stato calcolato il numero di Reynolds, definito come:

$$Re = \frac{v \cdot D \cdot \rho}{\mu} \quad (4.1)$$

dove  $v$  rappresenta la velocità media valutata in corrispondenza di una sezione caratterizzata da un profilo sviluppato,  $D$  è il diametro equivalente della sezione quadratica,  $\rho$  e  $\mu$  sono rispettivamente la densità e la viscosità del fluido, entrambe funzioni del valore di ematocrito considerato (Eq. 1.1 e 1.6). Nella Tabella III in Appendice vengono riportati i valori di Reynolds ( $Re$ ) calcolati tramite le simulazioni. E' stato osservato che il valore massimo calcolato è pari a 28,74.

### 4.1.2 Linee di flusso

Sono state effettuate simulazioni in diverse condizioni di confinamento, al fine di valutare come questo parametro possa influenzare l'efficacia di incapsulamento. Nella seguente figura (Figura 4.4) sono mostrate le linee di flusso relative ai 3 casi valutati: nel primo caso si rappresentano le linee di flusso in presenza di confinamento pari al 25% (caso A), nel secondo caso in presenza di confinamento pari al 50% (caso B) e nel terzo e ultimo caso in presenza di confinamento pari al 75% (caso C).



**Figura 4.4** - Linee di flusso relative alle tre differenti percentuali di confinamento (dall'alto):  
25%, 50% e 75%



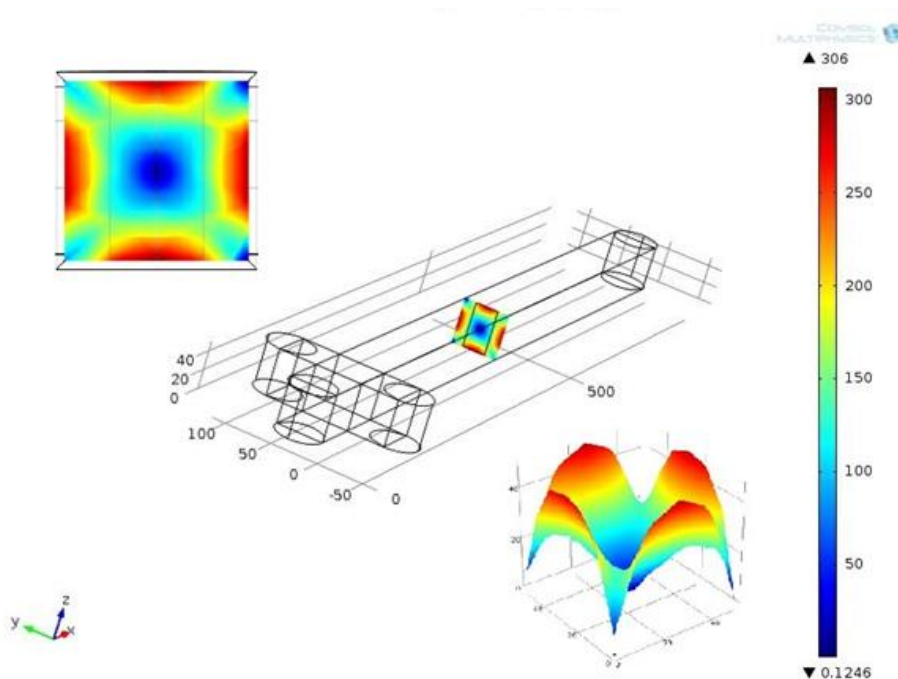
### 4.1.3 Shear stress

Il calcolo degli *shear stress* è stato effettuato sulla base del modello di Casson, precedentemente descritto nel Paragrafo 1.2.1.2. Per ciascun ematocrito considerato sono state calcolate le costanti  $\tau_0$  e  $\mu_c$  (come riportato in Tabella 4.1), mentre i valori di  $\dot{\gamma}$  sono stati ricavati dalla soluzione calcolata con il *Laminar Flow Model*.

**Tabella 4.1** - Yield Stress  $\tau_0$  e viscosità di Casson  $\mu_c$  in funzione dell'ematocrito Ht

Ht	$\tau_0$ [Pa]	$\mu_c$ [Pa·s]
1%	0	0,001895
5%	0,049521	0,002112
10%	0,124552	0,002445

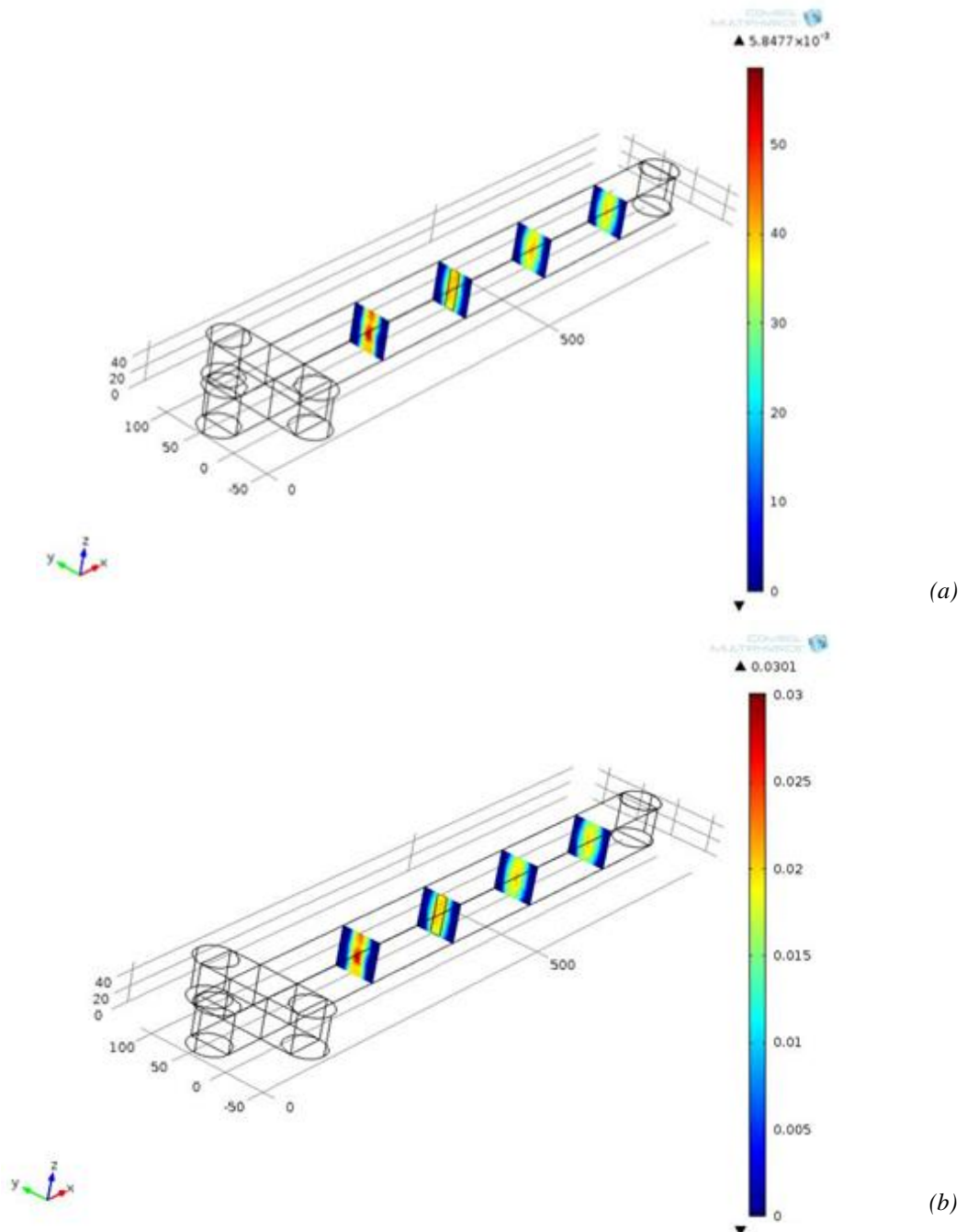
In Figura 4.5 si osserva la distribuzione spaziale degli sforzi di taglio in corrispondenza della sezione centrale del microcanale.

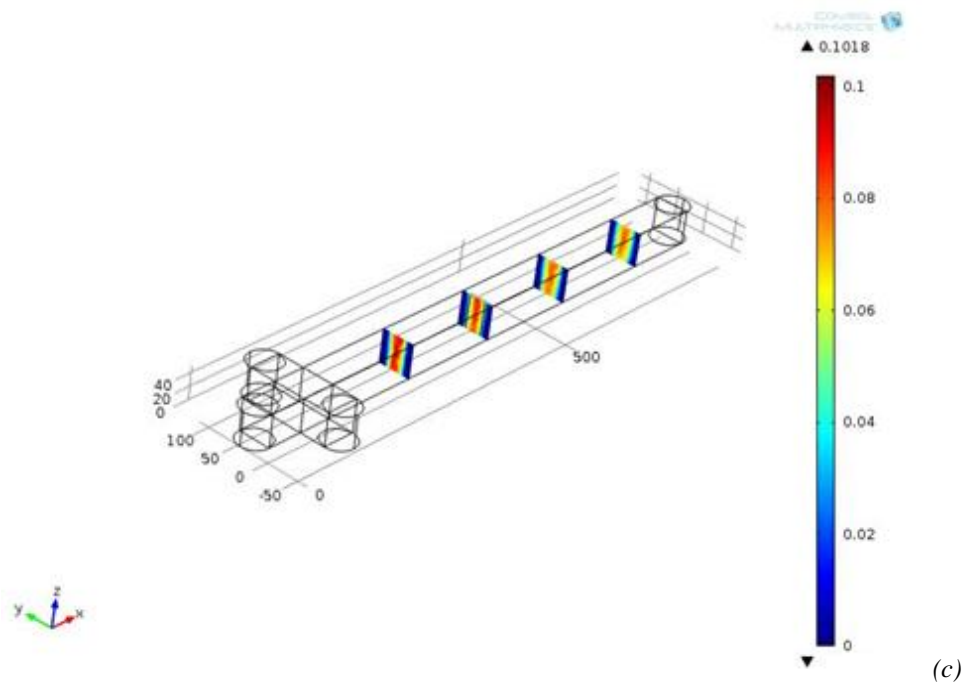


**Figura 4.5** - Profilo e valore degli sforzi di taglio (Pa) relativo ad una simulazione ad ematocrito pari al 10% e ad un confinamento pari al 50% ( $Q_{centrale} = 44 \mu\text{L}/\text{min}$  e  $Q_{laterali} = 22 \mu\text{L}/\text{min}$ )

### 4.1.4 Accumulo della fase dispersa

Mediante l'uso del *Mixture Model* è stato valutato l'andamento della fase dispersa su quattro sezioni del capillare, confrontando i risultati ottenuti al variare dell'ematocrito, come mostrato nella Figura 4.6.

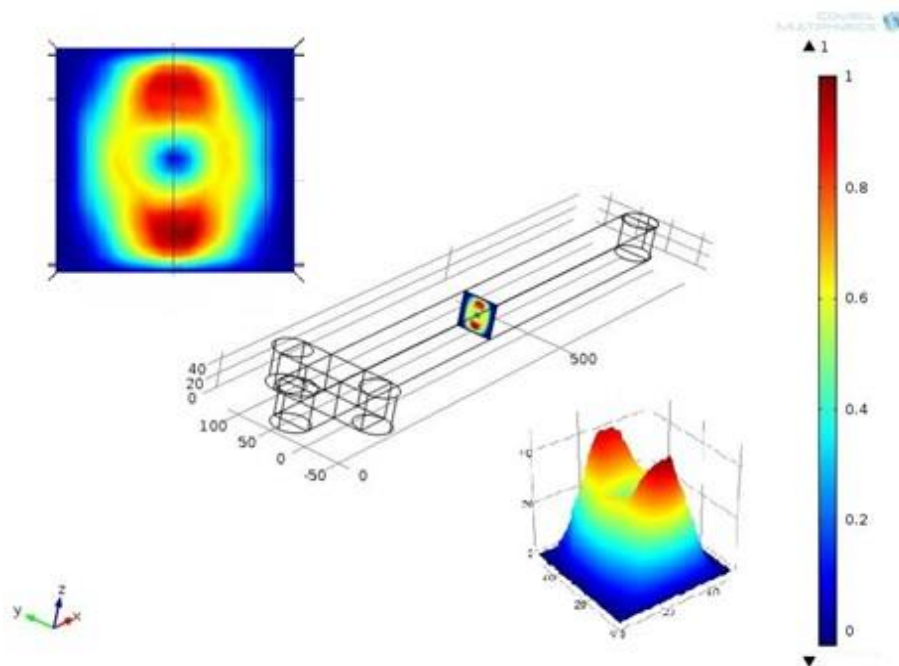




**Figura 4.6** - Distribuzione della fase dispersa lungo il canale, relativa ad una simulazione a: (a) ematocrito pari all'1% e confinamento pari al 25% ( $Q_{centrale} = 2 \mu\text{L}/\text{min}$  e  $Q_{laterali} = 3 \mu\text{L}/\text{min}$ ); (b) ematocrito pari al 5% e confinamento pari al 25% ( $Q_{centrale} = 2 \mu\text{L}/\text{min}$  e  $Q_{laterali} = 3 \mu\text{L}/\text{min}$ ); (c) ematocrito pari al 10% e confinamento pari al 50% ( $Q_{centrale} = 22 \mu\text{L}/\text{min}$  e  $Q_{laterali} = 11 \mu\text{L}/\text{min}$ )

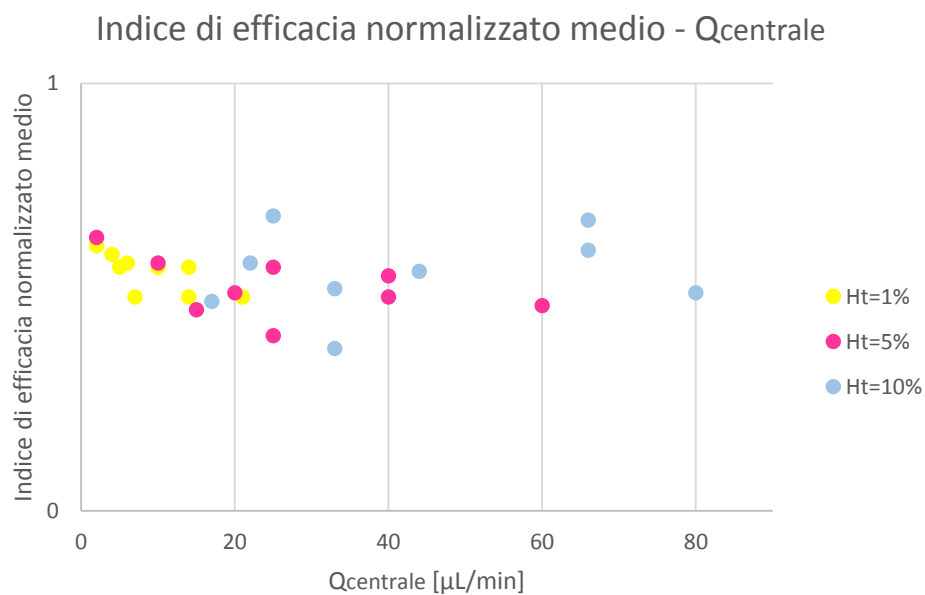
#### 4.1.5 Indice di efficacia

Per valutare l'efficacia di incapsulamento, è stato ideato un indice capace di localizzare le zone in cui sono presenti i maggiori sforzi di taglio, le maggiori velocità del fluido e la maggior quantità di fase dispersa all'interno del microcanale. L'indice è stato definito come il prodotto normalizzato tra questi tre valori. E' stato calcolato in seguito un indice di efficacia normalizzato medio di ciascuna prova in modo da poter paragonare tra loro i valori ottenuti per le diverse prove e individuare con quali parametri del setup il processo di incapsulamento risulterebbe più efficace, compatibilmente con i risultati del Paragrafo 4.3. In Figura 4.7 vengono riportati il profilo e i valori dell'indice di efficacia normalizzato.



**Figura 4.7** - Profili e valori dell'indice di efficacia normalizzato relativo ad una simulazione ad ematocrito pari al 5% e ad un confinamento pari al 75% ( $Q_{centrale} = 40 \mu\text{L}/\text{min}$  e  $Q_{laterali} = 6,67 \mu\text{L}/\text{min}$ )

Il valore degli indici di efficacia normalizzati medi nelle diverse prove è riportato in Figura 4.8.



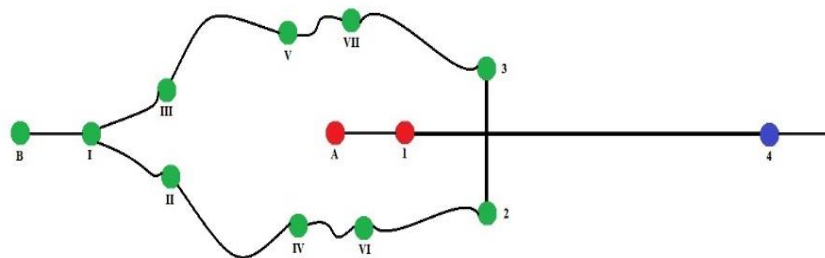
**Figura 4.8** - Indici di efficacia normalizzati medi in funzione della  $Q_{centrale}$ , distinti per valore di  $Ht$

## 4.2 Prove di tenuta del circuito

In questo paragrafo vengono riportati i risultati relativi alle prove di tenuta del circuito effettuate. Per ciascun tipo di prova vengono descritti nel dettaglio gli eventi e gli accorgimenti attuati al fine di mantenere, fin quando possibile, in tenuta il circuito.

### 4.2.1 Prova 1

In Figura 4.9 viene ripresentato lo schema del circuito relativo alla Prova 1, in modo da evidenziare la nomenclatura delle connessioni d'interesse.



*Figura 4.9 - Schema del circuito relativo alla Prova 1 e relativa nomenclatura delle connessioni*

Tale circuito non presenta problemi di tenuta in corrispondenza di una portata totale pari a 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ . All'aumentare delle portate, tuttavia, si iniziano ad osservare gocciolamenti in corrispondenza di alcune connessioni, rendendo così necessario il rafforzamento delle connessioni stesse tramite l'utilizzo di teflon e, in alcuni casi, di colla (attack) per la chiusura di eventuali fori presenti a livello del tubo di connessione. Tramite questi accorgimenti, è stato possibile mantenere il circuito in tenuta fino a un valore di portata totale pari a 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Applicando portate corrispondenti a  $\Delta p = 5 \text{ atm}$  (75  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), invece, si è osservato il cedimento delle connessioni precedentemente già rafforzate con teflon e colla. Alla luce di questi risultati si è scelto di non utilizzare la connessione a y all'interno del circuito, in quanto la presenza di tale componente comporta numerose connessioni, critiche per la tenuta del circuito, e una maggiore presenza di queste ha come conseguenza un maggior rischio di distacco dei tubi del circuito. In Tabella 4.2 vengono riportate, distinte per perdite di carico e relative portate imposte, le perdite delle connessioni e i conseguenti accorgimenti attuati volte a riportare in tenuta il circuito.

Tabella 4.2 - Tenuta del circuito durante la Prova 1

$\Delta P$ [Pa]	$Q_{tot}$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Perdita della tenuta	Accorgimenti
1	15	/	/
2	30	Distacco connessione B	Teflon in B
3	45	Distacco connessione A e VII	Teflon in A e VII + attack in VII
4	60	Distacco connessione 3	Teflon in 3
5	75	Distacco connessione 2, 1 e A	<u>Circuito non più in tenuta!</u>

#### 4.2.2 Prova 2

In Figura 4.10 viene ripresentato lo schema del circuito relativo alla Prova 2, in modo da evidenziare la nomenclatura delle connessioni d'interesse.

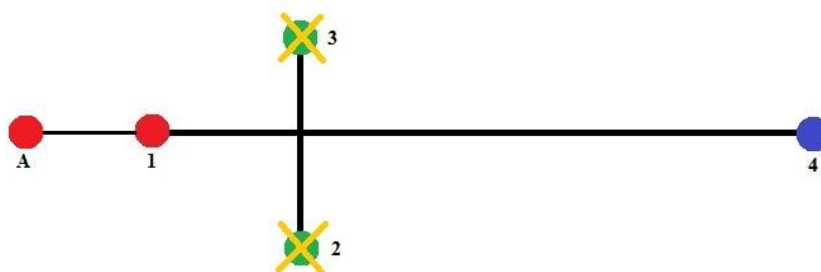


Figura 4.10 - Schema del circuito relativo alla Prova 2 e relativa nomenclatura delle connessioni

Il circuito non ha mostrato problemi di tenuta in corrispondenza di portate totali pari a 15 e 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Per una portata di 45  $\mu\text{L}/\text{min}$ , invece, è avvenuto il distacco del tubo di connessione che univa l'ago della pompa siringa al microcanale, a livello della connessione 1. Si è scelto dunque di applicare a livello della connessione 1 uno strato di Teflon in grado di impedire questo distacco. Grazie a questo accorgimento il circuito ha garantito la tenuta per una portata imposta di 45  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Successivamente si è scelto di imporre a livello della pompa siringa una portata di 60  $\mu\text{L}/\text{min}$ , ma la connessione 1 ha ceduto nonostante il Teflon.

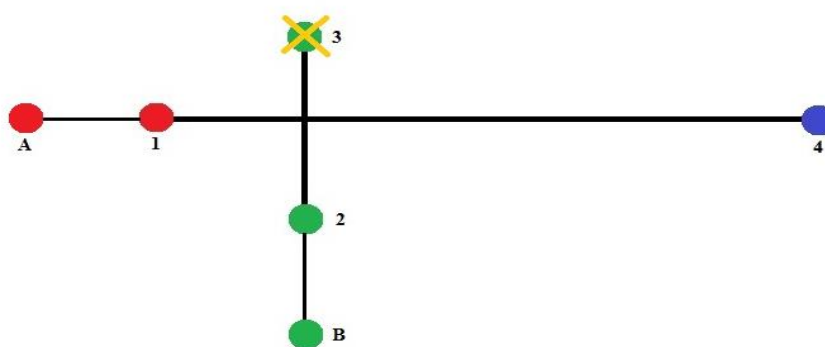
Si è pensato dunque di ricorrere ad altri metodi per immobilizzare questa connessione, tra i quali il posizionamento in sede di gomma pane, l'utilizzo di una combinazione di nastro isolante e di Teflon e l'accorciamento del tubo di connessione tra l'ago e l'ingresso del microcanale. Nonostante questi tentativi, non è stato possibile impedire il cedimento della connessione. Non è stato dunque possibile utilizzare il circuito con una portata totale di 75  $\mu\text{L}/\text{min}$ . In Tabella 4.3 vengono riportate, distinte per perdite di carico e relative portate imposte, le perdite delle connessioni e i conseguenti accorgimenti attuati volti a riportare in tenuta il circuito.

**Tabella 4.3 - Tenuta del circuito durante la Prova 2**

$\Delta P$ [Pa]	$Q_{\text{tot}}$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Perdita della tenuta	Accorgimenti
1	15	/	/
2	30	/	/
3	45	Distacco connessione 1	Teflon 1
4	60	Distacco connessione 1	<u>Circuito non più in tenuta!</u>

### 4.2.3 Prova 3

In Figura 4.11 viene ripresentato lo schema del circuito relativo alla Prova 3, in modo da evidenziare la nomenclatura delle connessioni d'interesse.



**Figura 4.11 - Schema del circuito relativo alla Prova 3 e relativa nomenclatura delle connessioni**

Durante questa prova non si sono verificati problemi di tenuta fino a valori di portata totale pari a 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Per un valore di portata totale di 45  $\mu\text{L}/\text{min}$ , invece, è avvenuto il gocciolamento del circuito a livello della connessione 1, oltre a un distacco del tubo di

connessione in 2. Dopo aver rinforzato opportunamente con Teflon la struttura in 1 e in 2, il circuito ha presentato una corretta tenuta fino a valori di portata totale di 75  $\mu\text{L}/\text{min}$ . In corrispondenza di questa portata il tubo ha iniziato a presentare un rigonfiamento in prossimità della connessione 1 ed è avvenuto nuovamente il distacco della connessione 2, rendendo impossibile il proseguimento della prova. In Tabella 4.4 vengono riportate, distinte per perdite di carico e relative portate imposte, le perdite delle connessioni e i conseguenti accorgimenti attuati volti a riportare in tenuta il circuito.

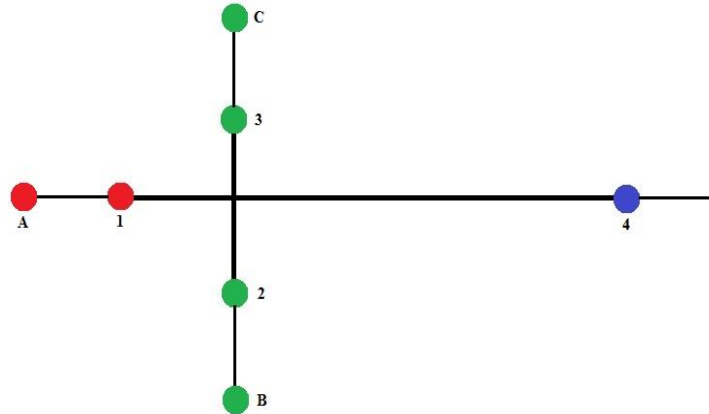
**Tabella 4.4** - Tenuta del circuito durante la Prova 3

$\Delta P$ [Pa]	$Q_{\text{tot}}$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Perdita della tenuta	Accorgimenti
1	15	/	/
2	30	/	/
3	45	Gocciolamento in 1, distacco connessione 2	Teflon in 1 e in 2
4	60	/	/
5	75	Rigonfiamento tubo siringa laterale, distacco connessione 2	<u>Circuito non più in tenuta!</u>



#### 4.2.4 Prova 4

In Figura 4.12 viene ripresentato lo schema del circuito relativo alla Prova 4, in modo da evidenziare la nomenclatura delle connessioni d'interesse.



*Figura 4.12 - Schema del circuito relativo alla Prova 4 e relativa nomenclatura delle connessioni*

Grazie a questo setup, utilizzando siringhe centrali e laterali di volumi diversi (1 mL e 2,5 mL) e alternandone il posizionamento tra una prova e l'altra, è stato possibile testare il comportamento del circuito al variare del confinamento (pari al 16%, ponendo centralmente la siringa da 1 mL e lateralmente le siringhe da 2,5 mL, e pari al 55% nel caso di siringa centrale da 2,5 mL e siringhe laterali da 1 mL) imposto dalle portate scelte. Durante le diverse prove, il circuito ha garantito la tenuta senza mostrare perdite di acqua, grazie a un abbondante strato di teflon posto in corrispondenza delle connessioni. La tenuta è stata garantita fino a portate tali da causare una caduta di pressione nel microcanale pari a 4 atm. In corrispondenza di una portata totale di 75  $\mu\text{L}/\text{min}$ , invece, è avvenuto il distacco a livello delle connessioni 1, 2, e 3, non rendendo più possibile lo svolgimento delle prove di tenuta. In Tabella 4.5 vengono riportate, distinte per perdite di carico e relative portate imposte, le perdite delle connessioni e i conseguenti accorgimenti attuati volti a riportare in tenuta il circuito.

**Tabella 4.5** - Tenuta del circuito durante la Prova 4

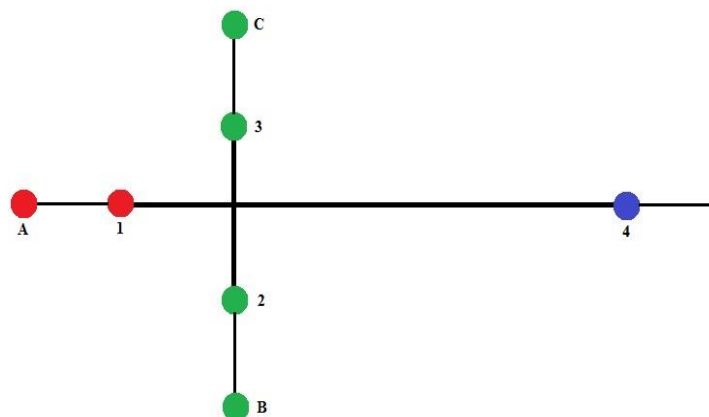
$\Delta P$ [Pa]	$Q_{tot}$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Perdita della tenuta	Accorgimenti
1	15	/	/
2	30	/	/
3	45	/	/
4	60	/	/
5	75	Rigonfiamento tubo siringa laterale (Figura 4.13), distacco connessione 2	<u>Circuito non più in tenuta!</u>



**Figura 4.13** - Rigonfiamento tubo siringa laterale relativo alla Prova 4

### 4.2.5 Prova 5

In Figura 4.14 viene ripresentato lo schema del circuito relativo alla Prova 5, in modo da evidenziare la nomenclatura delle connessioni d'interesse.



*Figura 4.14 - Schema del circuito relativo alla Prova 4 e relativa nomenclatura delle connessioni*

Grazie a questo setup, caratterizzato dalla presenza di due distinte pompe a siringa, è stato possibile svolgere prove con una percentuale di confinamento pari al 50% e al 75%, indipendentemente dal volume delle siringhe utilizzato. In entrambi i casi, utilizzando il metodo di rivestimento con Teflon su connessioni asciutte già adottato durante la Prova 4, il circuito ha presentato una corretta tenuta fino a portate totali di 60  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Per portate totali di 75  $\mu\text{L}/\text{min}$ , invece, vi è stato dapprima un rigonfiamento a livello della connessione 3 e successivamente il distacco delle connessioni 1 e 2, che non hanno reso possibile in alcun modo il proseguimento della prova. In Tabella 4.6 vengono riportate, distinte per perdite di carico e relative portate imposte, le perdite delle connessioni e i conseguenti accorgimenti attuati volti a riportare in tenuta il circuito.

Tabella 4.6 Tenuta del circuito durante la Prova 5

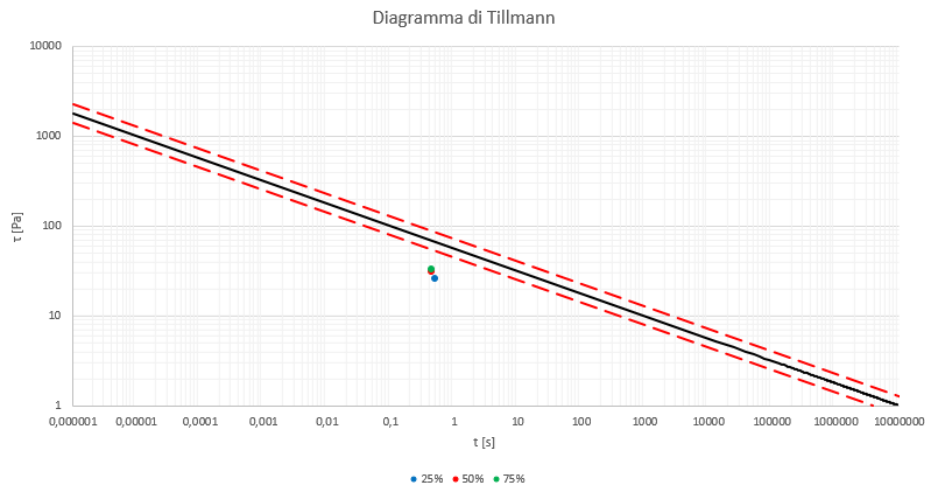
$\Delta P$ [Pa]	$Q_{tot}$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Perdita della tenuta	Accorgimenti
1	15	/	/
2	30	/	/
3	45	/	/
4	60	/	/
5	75	Rigonfiamento tubo siringa laterale sinistra, distacco connessioni 1 e 2	<u>Circuito non più in tenuta!</u>

Le prove di tenuta effettuate hanno consentito di comprendere il limite di utilizzo pratico del circuito realizzato nel presente lavoro di tesi. E' stato possibile, infatti, definire la portata totale massima applicabile al circuito e, dunque, ricavare la corrispondente perdita di carico massima applicabile durante le prove d'incapsulamento, pari a 4 atm.

### 4.3 Ottimizzazione dei parametri: scelta delle prove sperimentali

Sulla base del criterio di selezione descritto nel Paragrafo 3.4.2, sono state individuate le condizioni di prova da utilizzare per la successiva parte sperimentale.

Si è scelto di non effettuare alcuna prova ad ematocrito pari all'1% poiché non è stato possibile individuare punti di lavoro in grado di soddisfare il requisito primario relativo alla distanza "punto - retta di Tillmann". Infatti, i punti di lavoro corrispondenti alle massime portate centrali ammissibili per garantire la corretta diffusione della molecola probante sono risultati tutti al di sotto della retta di Tillmann e ad una distanza da essa maggiore della  $d_{limite}$  (Figura 4.15).



**Figura 4.15** - Posizionamento nel piano  $\tau - t$  dei punti di lavoro corrispondenti alle massime portate centrali ammissibili, per ematocrito pari all'1%

Per quanto riguarda le prove ad ematocrito pari al 5% e al 10%, sulla base dei criteri di selezione descritti nel Paragrafo 3.4.2, sono stati individuati i seguenti punti di lavoro:

- Ht = 5%, caso A,  $Q_{\text{centrale}} = 14,83 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $Q_{\text{laterali}} = 22,25 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $\Delta P = 4 \text{ atm}$ ;
- Ht = 5%, caso B,  $Q_{\text{centrale}} = 27,88 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $Q_{\text{laterali}} = 13,94 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $\Delta P = 4 \text{ atm}$ ;
- Ht = 5%, caso C,  $Q_{\text{centrale}} = 38,78 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $Q_{\text{laterali}} = 6,46 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $\Delta P = 4 \text{ atm}$ ;
- Ht = 10%, caso A,  $Q_{\text{centrale}} = 13,29 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $Q_{\text{laterali}} = 19,94 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $\Delta P = 3,4 \text{ atm}$ ;
- Ht = 10%, caso B,  $Q_{\text{centrale}} = 25,41 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $Q_{\text{laterali}} = 12,71 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $\Delta P = 3,7 \text{ atm}$ ;
- Ht = 10%, caso C,  $Q_{\text{centrale}} = 36,13 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $Q_{\text{laterali}} = 6,02 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $\Delta P = 3,9 \text{ atm}$ .

## 4.4 Prove di validazione del modello computazionale

Nel seguente capitolo vengono riportati i risultati relativi alle prove di validazione del modello computazionale.

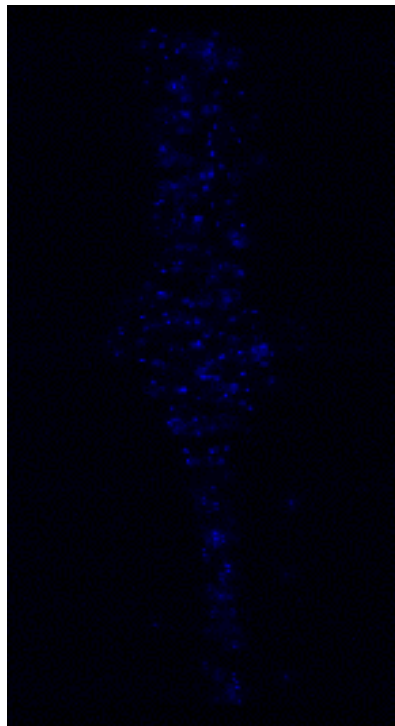
### 4.4.1 Prova $\alpha$

Le caratteristiche principali della Prova  $\alpha$  vengono riportate in Tabella 4.7:

*Tabella 4.7 - Caratteristiche principali della Prova  $\alpha$*

Ht	% confinamento	$Q_{\text{centrale}} - Q_{\text{sx}} - Q_{\text{dx}}$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Ingrandimento
5	50	10 - 5 - 5	20x

In Figura 4.16 viene riportata un'immagine ricavata alla  $\mu\text{PIV}$ , tramite il software INSIGHT3G, utilizzando un'ottica 20x in corrispondenza del tratto d'intersezione tra il canale centrale e i due canali laterali.



*Figura 4.16 - Particelle traccianti in polistirene a livello dell'intersezione del canale centrale con i due canali laterali*

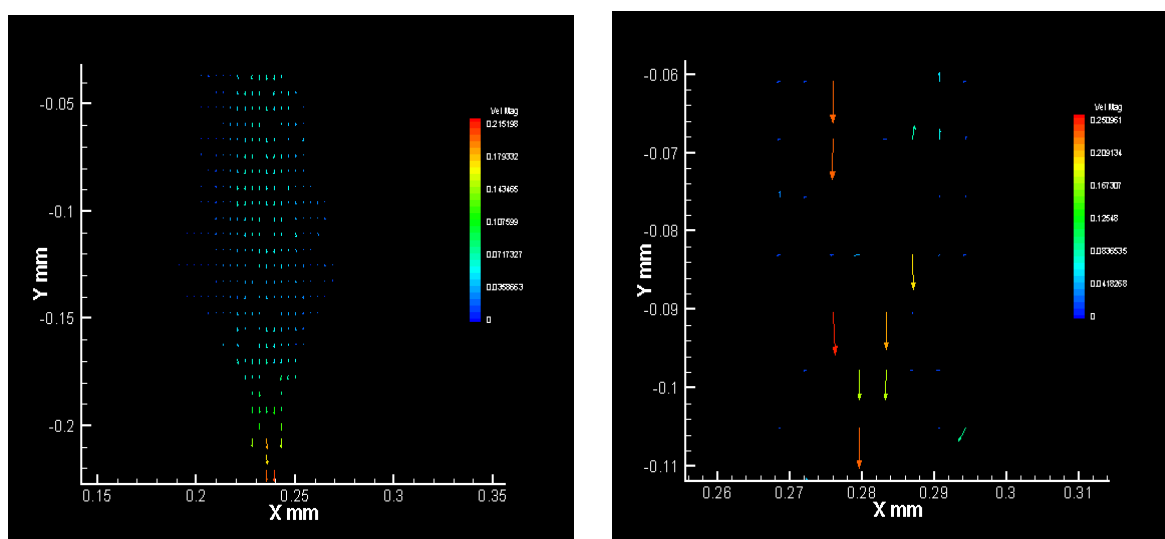
### 4.4.2 Prova $\beta$

Le caratteristiche principali della Prova  $\beta$  vengono riportate in Tabella 4.8:

**Tabella 4.8** - Caratteristiche principali della Prova  $\beta$

Ht	% confinamento	$Q_{\text{centrale}} - Q_{\text{sx}} - Q_{\text{dx}}$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Ingrandimento
1	25	6 - 9 - 9	20x

In Figura 4.17 vengono riportati i vettori velocità all'interno del capillare. La Figura 4.17 (a) riguarda il tratto iniziale del capillare, in corrispondenza del punto di intersezione tra il canale centrale e i due laterali. La Figura 4.17 (b) riguarda una sezione del capillare presa ad una distanza significativa dall'*Entry Length*, laddove dunque il moto può ritenersi completamente sviluppato. I dati sono stati elaborati in TECPLOT per consentire la visualizzazione.



**Figura 4.17** - Campo vettoriale (m/s) calcolato con un ingrandimento 20x per una  $Q_{\text{centrale}}$  pari a 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  in corrispondenza: del punto di intersezione tra il canale centrale e i due laterali (a) e di una posizione presa a distanza significativa dall'imbocco (b)

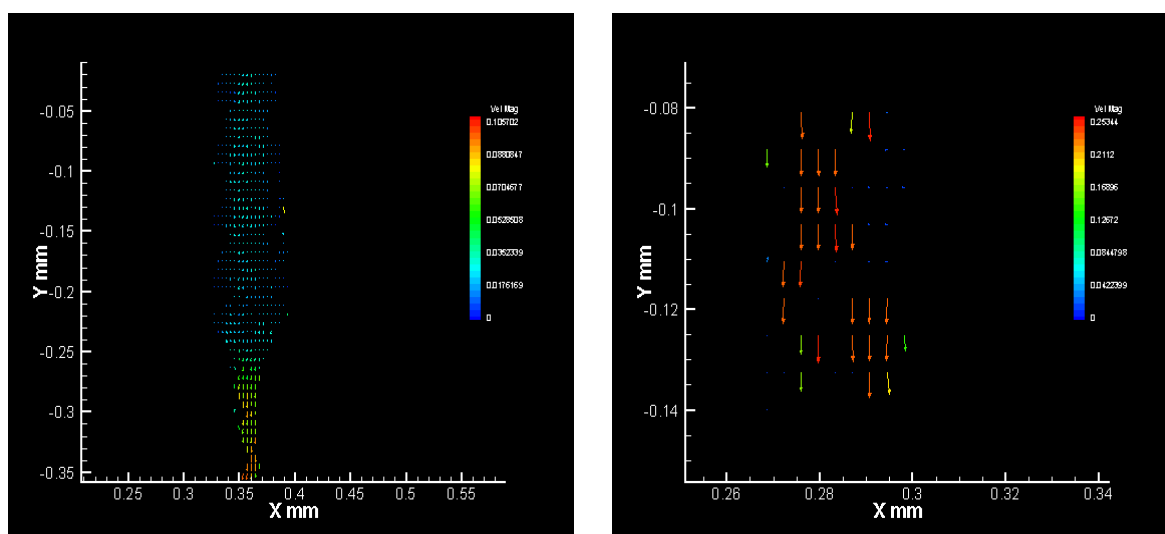
### 4.4.3 Prova $\gamma$

Le caratteristiche principali della Prova  $\gamma$  vengono riportate in Tabella 4.9:

*Tabella 4.9 - Caratteristiche principali della Prova  $\gamma$*

Ht	% confinamento	$Q_{\text{centrale}} - Q_{\text{sx}} - Q_{\text{dx}}$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Ingrandimento
1	50	10 - 5 - 5	20x

In Figura 4.18 vengono riportati i vettori velocità all'interno del capillare. La Figura 4.18 (a) riguarda il tratto iniziale del capillare, in corrispondenza del punto di intersezione tra il canale centrale e i due laterali. La Figura 4.18 (b) riguarda una sezione del capillare presa ad una distanza significativa dall'*Entry Length*, laddove dunque il moto può ritenersi completamente sviluppato. I dati sono stati elaborati in TECPLOT per consentire la visualizzazione.



**Figura 4.18** - Campo vettoriale (m/s) calcolato con un ingrandimento 20x per una  $Q_{\text{centrale}}$  pari a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  in corrispondenza: del punto di intersezione tra il canale centrale e i due laterali (a) e di una posizione presa a distanza significativa dall'imbocco (b)



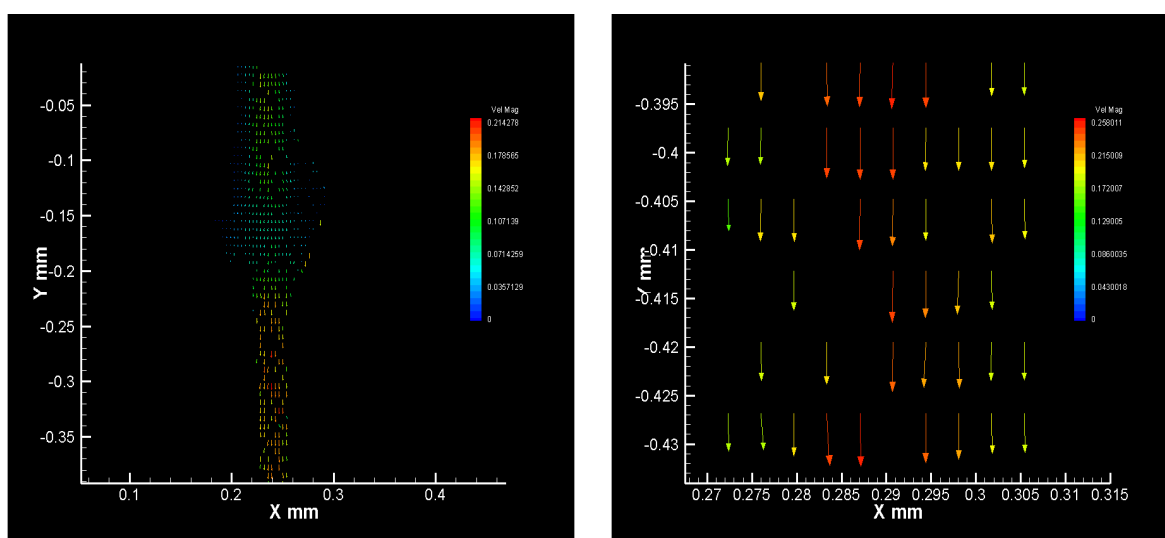
#### 4.4.4 Prova $\delta$

Le caratteristiche principali della Prova  $\delta$  vengono riportate in Tabella 4.10:

*Tabella 4.10 - Caratteristiche principali della Prova  $\delta$*

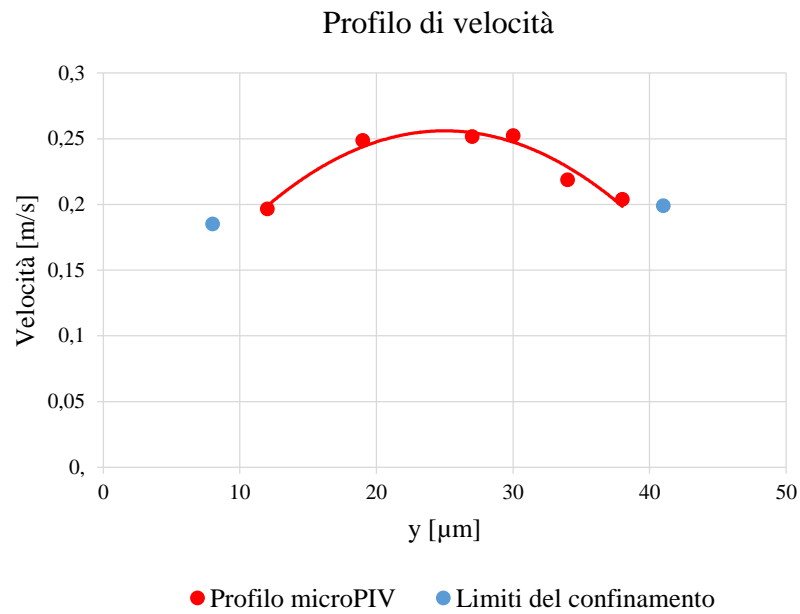
Ht	% confinamento	$Q_{\text{centrale}} - Q_{\text{sx}} - Q_{\text{dx}}$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Ingrandimento
1	75	14 - 2,3 - 2,3	20x

In Figura 4.19 vengono riportati i vettori velocità all'interno del capillare. La Figura 4.19 (a) riguarda il tratto iniziale del capillare, in corrispondenza del punto di intersezione tra il canale centrale e i due laterali. La Figura 4.19 (b) riguarda una sezione del capillare presa ad una distanza significativa dall'*Entry Length*, laddove dunque il moto può ritenersi completamente sviluppato. I dati sono stati elaborati in TECPLOT per consentire la visualizzazione.



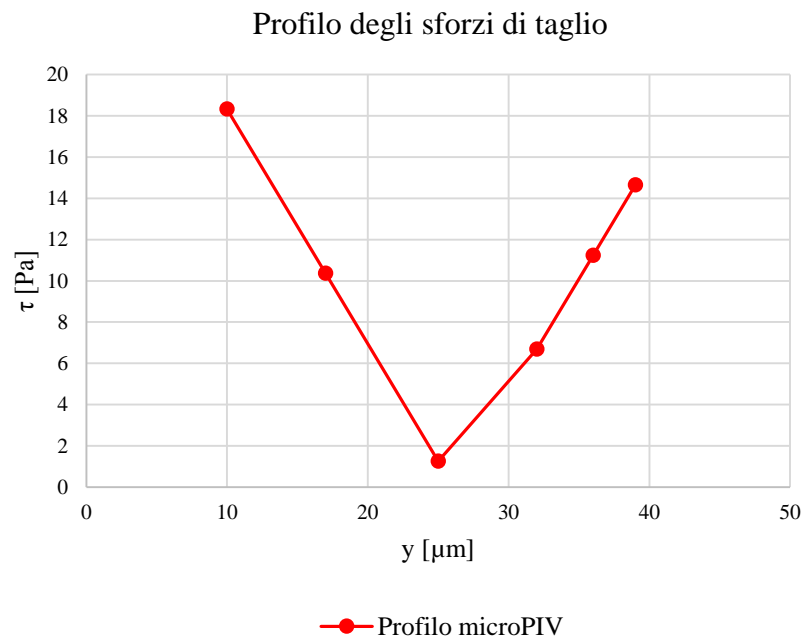
*Figura 4.19 - Campo vettoriale (m/s) calcolato con un ingrandimento 20x per una  $Q_{\text{centrale}}$  pari a 14  $\mu\text{L}/\text{min}$  in corrispondenza: del punto di intersezione tra il canale centrale e i due laterali (a) e di una posizione presa a distanza significativa dall'imbocco (b)*

In Figura 4.20 viene riportato il profilo di velocità ottenuto tramite Excel. In rosso vengono riportati i punti, corrispondenti alla portata centrale, utilizzati per la definizione del profilo di velocità. In blu, invece, vengono rappresentati i punti a livello dell'interfaccia con i flussi di confinamento di PBS.



**Figura 4.20** - Andamento del profilo di velocità per una portata  $Q_{centrale} = 14 \mu\text{l}/\text{min}$  e un ingrandimento 20X ottenuto mediante elaborazione dei dati con Excel ( $R^2 = 0,9439$ )

In Figura 4.21 viene riportato il profilo degli sforzi di taglio calcolati utilizzando la relazione di Casson.



**Figura 4.21** - Andamento del profilo degli sforzi di taglio per una portata  $Q_{centrale} = 14 \mu\text{l}/\text{min}$  e un ingrandimento 20X ottenuto mediante elaborazione dei dati con Excel

## 5 - DISCUSSIONE

### 5.1 Modello computazionale

Il profilo di velocità estratto dal modello computazionale (Figura 4.1) si presenta di tipo parabolico e simmetrico rispetto all'asse del capillare, con valore nullo alle pareti e con valore massimo al centro. Tale profilo di velocità si mantiene inalterato a partire da una distanza limite dagli ingressi laterali pari a 33,7  $\mu\text{m}$ , valore confermato dai calcoli analitici dell'*Entry Length* per flussi laminari (cfr. Paragrafo 3.1.1.1). In Figura 4.3 si osserva come il profilo di velocità sia totalmente sviluppato per un valore superiore all'*Entry Length*, confermando la validità dei calcoli svolti analiticamente. Un'ulteriore conferma della laminarità del moto è stata effettuata tramite l'analisi dei numeri di Reynolds presenti nelle diverse simulazioni. Il valore massimo, pari a 28,74, è molto inferiore al valore di soglia dei moti di transizione, pari a 2000.

L'immagine relativa alle linee di flusso (Figura 4.4) mostra come la percentuale di sezione occupata dalle linee di flusso provenienti dall'ingresso centrale sia pari alla percentuale di confinamento impostata tramite la selezione delle portate centrali e laterali. Si può notare inoltre l'assenza di mescolamento tra i filetti fluidi della portata centrale e quelli delle portate laterali, confermando dunque un corretto funzionamento della tecnica di confinamento nel caso in esame.

In Figura 4.5 si può notare che gli sforzi di taglio nel microcanale presentano un andamento lineare con valore massimo in parete e un valore nullo al centro del capillare. Il profilo ricavato conferma le aspettative basate sulle nozioni teoriche di moto in flusso laminare.

Studi precedenti hanno riscontrato come critica la condizione di accumulo di globuli rossi sul fondo del canale, in presenza di basse portate di esercizio. E' noto, infatti, come i globuli rossi, in presenza di basse portate e dunque di basse velocità, tendano ad aggregarsi sotto forma di *rouleaux*, con conseguenti problemi di coagulazione. Tale fenomeno risulterebbe assai critico per l'applicazione in studio, in quanto rappresenterebbe una possibile causa di occlusione del capillare e quindi di diminuzione dell'efficacia del processo. I globuli rossi a contatto con la base del capillare non si verrebbero infatti a trovare nelle adeguate condizioni

che permetterebbero l'incapsulamento. In Figura 4.6 si osserva come la fase dispersa si disponga omogeneamente all'interno della sezione di confinamento, permettendo quindi l'ottimizzazione del processo di incapsulamento. I risultati delle simulazioni computazionali, grazie a tale geometria, non presentano accumulo della fase dispersa neanche nei casi limite con portate più basse.

L'indice di efficacia normalizzato (Figura 4.7) presenta valori nulli in corrispondenza del centro e delle pareti del canale in ciascuna delle simulazioni effettuate. Esso presenta due picchi a livello della sezione di confinamento (uno nella parte superiore del canale e uno nella parte inferiore), in corrispondenza della quale la fase dispersa è concentrata. L'indice di efficacia normalizzato medio permette di confrontare tra loro diverse prove, individuando quali di queste presentano una maggiore omogeneità di incapsulamento nella sezione valutata.

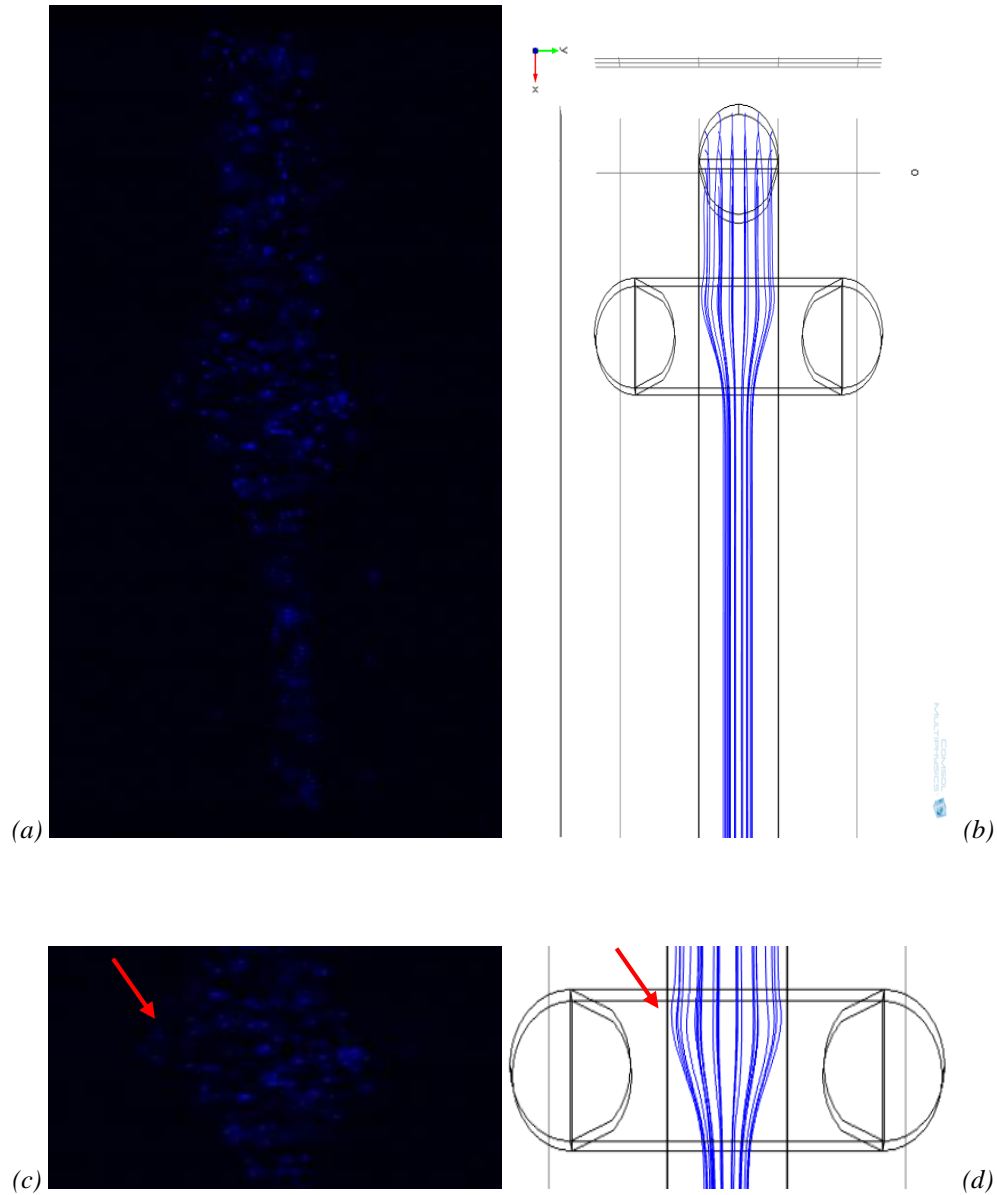
## 5.2 Prove di validazione del modello computazionale

### 5.2.1 Prova $\alpha$

Le analisi su campioni di sangue alla  $\mu$ PIV vengono comunemente effettuate su fluidi monofase nei quali vengono poste delle particelle traccianti fluorescenti. Un'eventuale fase dispersa, infatti, comporterebbe problemi di visualizzazione delle immagini acquisite, poiché le zone occupate dalle molecole indurrebbero una parziale mancanza di fluorescenza nelle immagini. Per questo motivo, studi precedenti hanno mostrato come sia possibile effettuare le prove alla  $\mu$ PIV con soluzioni eritrocitarie caratterizzate da un ematocrito non superiore all'1%. Si è scelto quindi di effettuare una prova a ematocrito 5% per verificare questa ipotesi.

In Figura 5.1 (a) è possibile apprezzare il confinamento imposto dai flussi laterali di PBS. Tale immagine viene confrontata con le linee di flusso relative alla portata centrale, ricavate dalla simulazione computazionale per gli stessi parametri di prova (Figura 5.1 (b)). In Figura 5.1 (c) viene evidenziato nel dettaglio il posizionamento delle particelle traccianti in corrispondenza dell'intersezione con i flussi laterali. Tale andamento viene confrontato con

la Figura 5.1 (d); è possibile osservare in entrambi i casi un parziale aumento della sezione di canale occupata dalla portata centrale (frecche rosse in Figura 5.1 (c) e 5.1 (d)).



**Figura 5.1** - Prova  $\alpha$  - Particelle traccianti in polistirene a livello dell'intersezione del canale centrale con i due laterali (a); immagine ricavata dal modello computazionale relativa alle linee di flusso della portata centrale a livello dell'intersezione del canale centrale con i due laterali (b); dettaglio delle particelle traccianti a livello dell'intersezione (c); dettaglio delle linee di flusso prese dal modello computazionale a livello dell'intersezione (d)

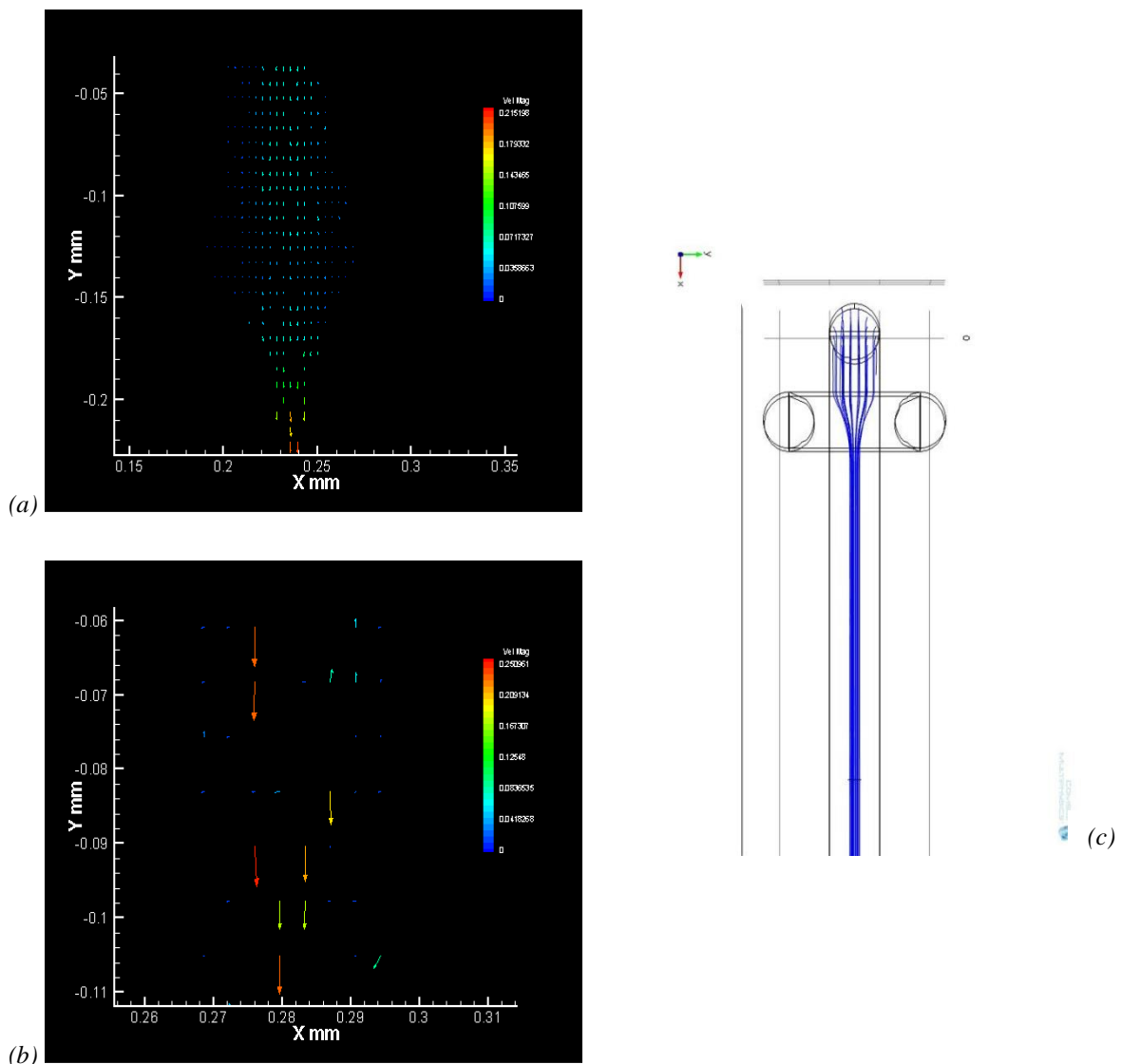
Questo allargamento potrebbe essere dovuto all'azione delle portate di confinamento laterali, le quali, incidendo sulla portata centrale, ne comportano a monte un aumento della sezione. A valle dell'intersezione, infatti, la porzione di canale occupata dalla portata centrale viene dimezzata, comportando un aumento della resistenza al flusso del canale. Un'ulteriore spiegazione di tale allargamento può essere data dal fatto che il fluido centrale si ritrova a scorrere in una zona del capillare (sede dell'intersezione delle portate) caratterizzata da assenza di pareti: ciò comporta, dunque, una distribuzione del fluido su una sezione maggiore

In Figura 5.1 (a), inoltre, si nota come le particelle traccianti presentino una distribuzione non omogenea, con la presenza di agglomerati probabilmente dovuti alla parziale aderenza particellare sulla membrana stromale.

In Figura 5.1 (a) è possibile osservare delle zone a sfondo nero, potenzialmente occupate dagli eritrociti. Tali zone indesiderate risultano problematiche nella fase di calcolo, in quanto costituiscono assenza localizzata di informazione. E' stata dunque confermata la scelta di effettuare prove alla  $\mu$ PIV con valori di ematocrito pari all'1%, finalizzando la Prova  $\alpha$  alla definizione dei parametri ottimali da utilizzare nelle successive prove di validazione.

### 5.2.2 Prova $\beta$

Tramite il campo vettoriale di velocità ricavato mediante il software TECPLOT a partire dalle immagini ottenute con la  $\mu$ PIV, è stato possibile confermare l'avvenuto confinamento, pari al 25%, del flusso centrale. In Figura 5.2 (a) si osserva il restringimento a forma di imbuto presente a valle dell'intersezione della portata centrale con quelle laterali, mentre in Figura 5.2 (b) è possibile osservare, nel dettaglio, lo spessore relativo alla sola portata centrale valutato in una sezione lontana dagli ingressi del microcanale.



**Figura 5.2** - Prova  $\beta$  - Campo vettoriale (m/s) calcolato relativo al punto di intersezione tra la portata centrale e quelle laterali (a); campo vettoriale calcolato relativo ad una sezione presa lontano dagli ingressi laterali (b); immagine ricavata dal modello computazionale relativa alle linee di flusso della portata centrale a livello dell'intersezione del canale centrale con i due laterali (c)

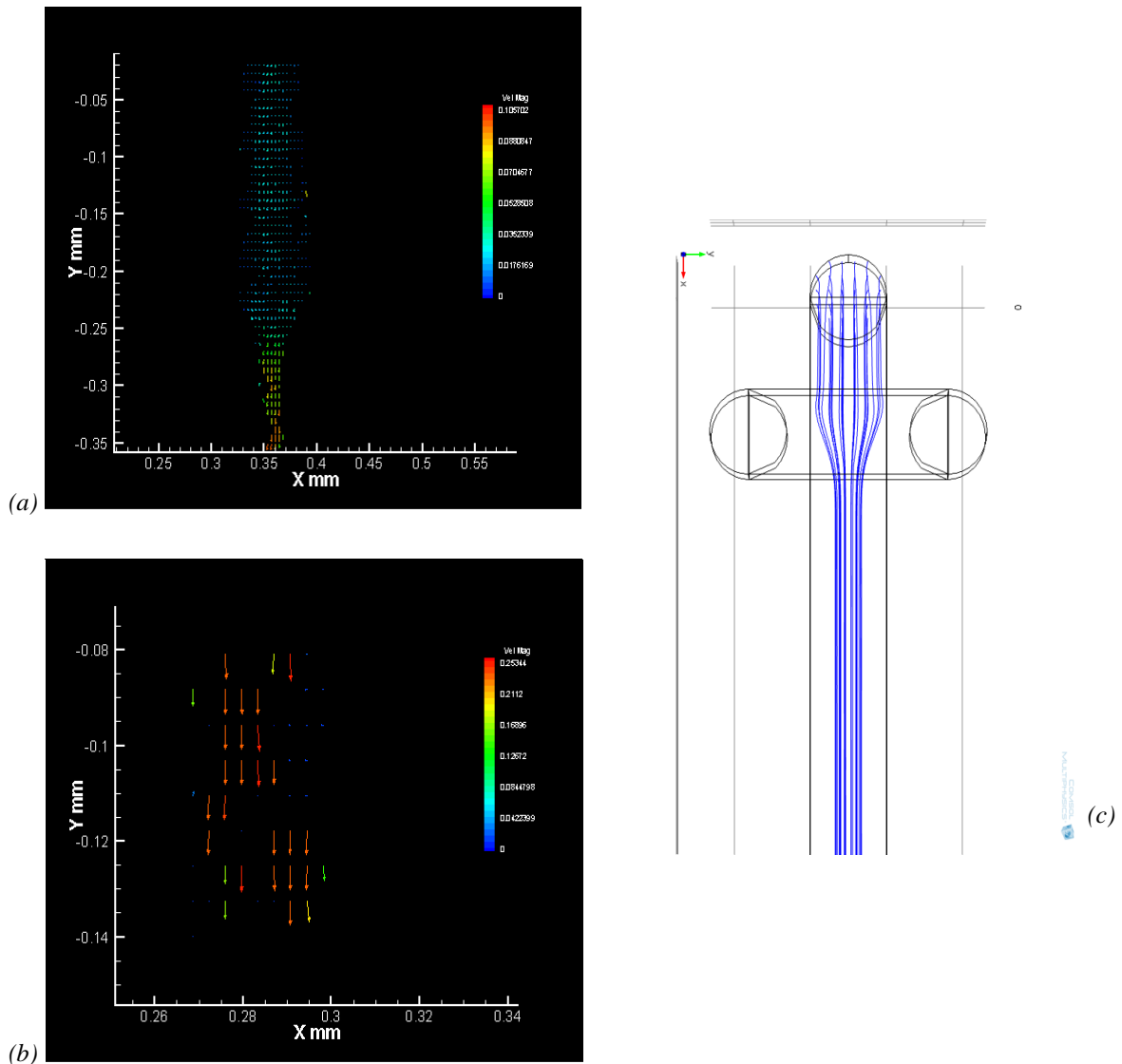
In Figura 5.2 (a), in particolare, si nota come la sezione di portata centrale venga ridotta in maniera significativamente superiore rispetto a quanto avviene nelle altre prove effettuate, evidenziando, come previsto, un maggiore confinamento. In Figura 5.2 (b) si è valutata la larghezza della sezione occupata dalla portata centrale, corrispondente a circa 12  $\mu\text{m}$ , confermando quanto atteso dalle simulazioni computazionali (Figura 5.2 (c)) e dai calcoli analitici, nei quali il risultato ottenuto è pari a 12,5  $\mu\text{m}$ .

Infine, sono stati paragonati i valori di velocità massimi in corrispondenza della sezione centrale del canale ottenuti dal software TECPLOT e dal modello computazionale. Nel primo caso, il valore della velocità massima è risultato pari a 0,25 m/s mentre nel secondo caso è risultato pari a 0,33 m/s. Tale differenza potrebbe essere dovuta in primo luogo ad una scarsità di particelle traccianti presenti nella sezione in cui scorre la portata centrale del microcanale; un aumento di tale quantità garantirebbe infatti la disponibilità di un maggior numero di dati da processare. A fronte di un confinamento pari al 25%, la sezione relativa alla portata centrale risulta ridotta di ben 4 volte rispetto alla sezione totale del canale. Ne consegue che i globuli rossi, se presenti, si troverebbero ad occupare una percentuale consistente della sezione disponibile al passaggio della portata centrale, compromettendo dunque una corretta elaborazione delle immagini. Per queste stesse ragioni, si è reso impossibile effettuare dei paragoni in termini di valori medi di velocità tra i dati estratti con il software TECPLOT e i valori ricavati dal modello computazionale. È inoltre da notare come anche in precedenti studi i valori di velocità estratti dalle simulazioni computazionali risultano sovrastimare i valori sperimentali ricavati dal software TECPLOT.

### 5.2.3 Prova $\gamma$

I campi vettoriali ottenuti dalle immagini relative alla Prova  $\gamma$  confermano l'esatto confinamento del flusso centrale, pari al 50%. In Figura 5.3 (a) si osserva il restringimento a forma di imbuto presente a valle dell'intersezione della portata centrale con quelle laterali, mentre in Figura 5.3 (b) è possibile osservare, nel dettaglio, lo spessore relativo alla sola portata centrale valutato in una sezione lontana dagli ingressi del microcanale.





**Figura 5.3** - Prova  $\gamma$  - Campo vettoriale (m/s) calcolato relativo al punto di intersezione tra la portata centrale e quelle laterali (a); campo vettoriale calcolato relativo ad una sezione presa lontano dagli ingressi laterali (b); immagine ricavata dal modello computazionale relativa alle linee di flusso della portata centrale a livello dell'intersezione del canale centrale con i due laterali (c)

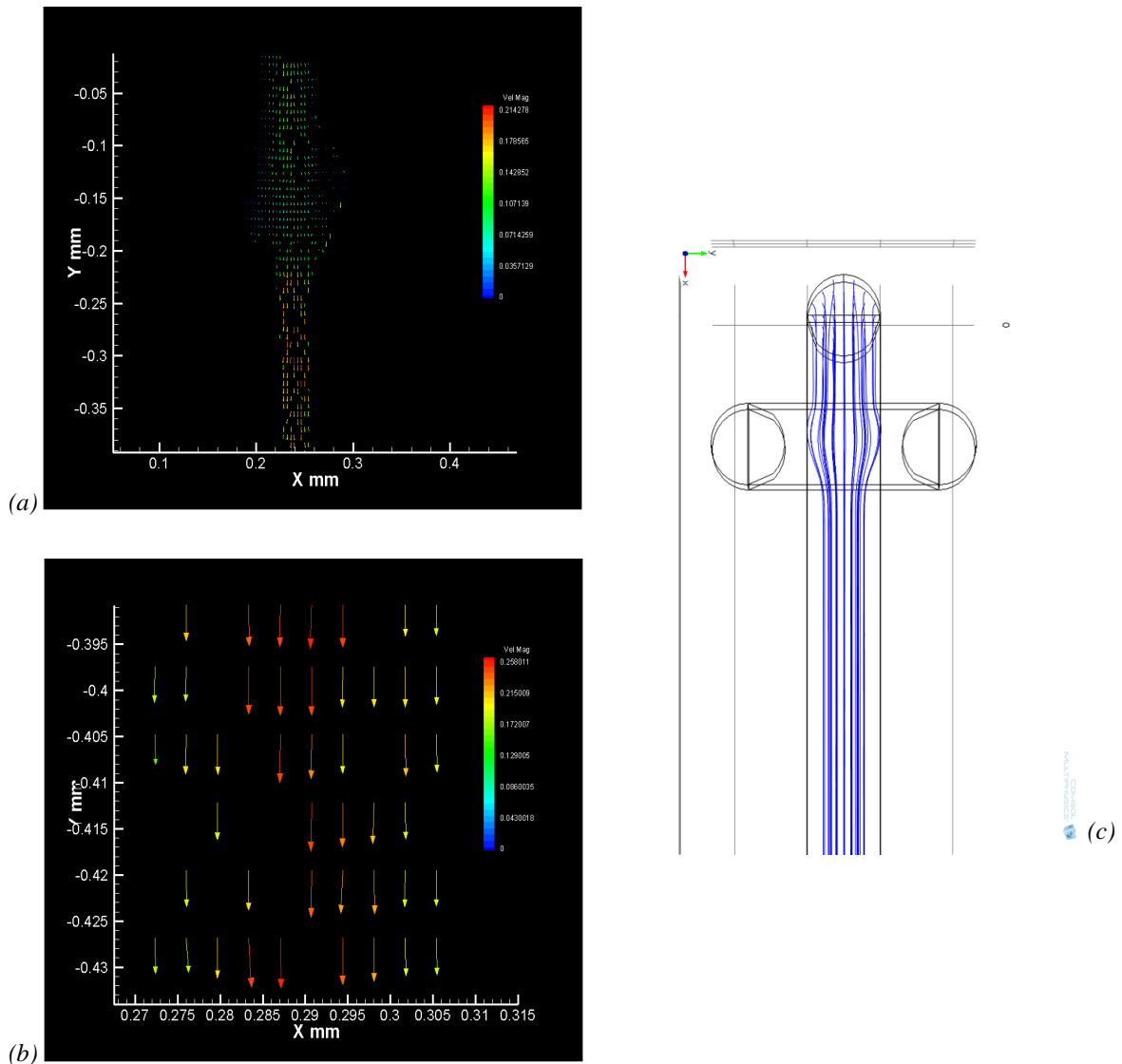
In Figura 5.3 (b) si è valutata la larghezza della sezione occupata dalla portata centrale, corrispondente a circa 25  $\mu\text{m}$ , confermando quanto atteso dalle simulazioni computazionali (Figura 5.3 (c)) e dai calcoli analitici, nei quali il risultato ottenuto è stato pari a 25  $\mu\text{m}$ .

Infine, sono stati paragonati i valori di velocità massimi in corrispondenza della sezione centrale del canale ottenuti dal software TECPLOT e dal modello computazionale. Nel primo caso, il valore della velocità massima è risultato pari a 0,25 m/s mentre nel secondo caso è risultato pari a 0,28 m/s. Tale differenza potrebbe essere dovuta in primo luogo ad

una scarsità di particelle traccianti presenti nella sezione in cui scorre la portata centrale del microcanale. Un aumento di tale quantità garantirebbe infatti la disponibilità di un maggior numero di dati da processare. A fronte di un confinamento pari al 50%, la sezione relativa alla portata centrale risulta dimezzata rispetto alla sezione totale del canale. Questo determina che i globuli rossi, se presenti, vanno ad occupare una percentuale consistente della sezione disponibile al passaggio della portata centrale, compromettendo dunque una corretta elaborazione delle immagini. Per queste stesse ragioni, si è reso impossibile effettuare dei paragoni in termini di valori medi di velocità tra i dati estratti con il software TECPLOT e i valori ricavati dal modello computazionale. È inoltre da notare come anche in precedenti studi i valori di velocità estratti dalle simulazioni computazionali risultano sovrastimare i valori sperimentali ricavati dal software TECPLOT.

#### 5.2.4 Prova $\delta$

I campi vettoriali ottenuti dalle immagini relative alla Prova  $\delta$  differiscono di poco dall'esatto confinamento del flusso centrale, pari al 75%. In Figura 5.4 (a) si osserva il restringimento a forma di imbuto presente a valle dell'intersezione della portata centrale con quelle laterali, mentre in Figura 5.4 (b) è possibile osservare, nel dettaglio, lo spessore relativo alla sola portata centrale valutato in una sezione lontana dagli ingressi del microcanale.



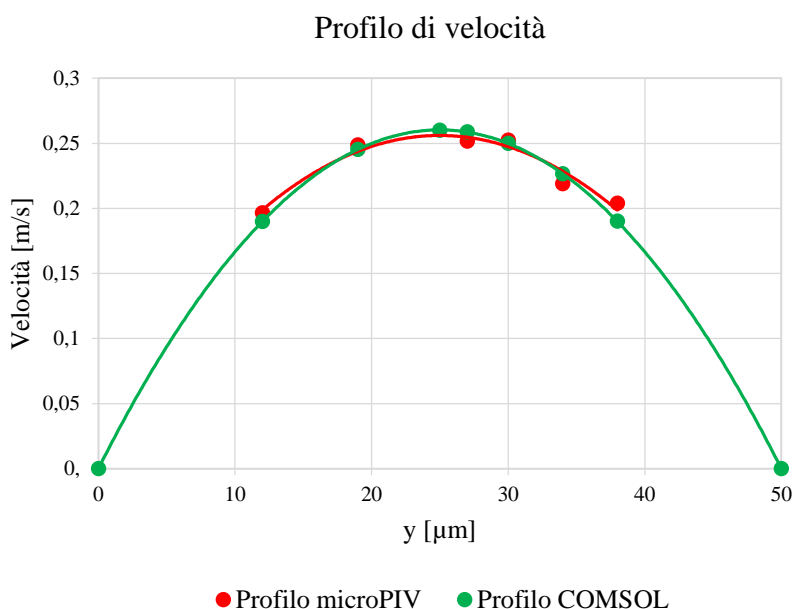
**Figura 5.4** - Prova  $\delta$  - Campo vettoriale (m/s) calcolato relativo al punto di intersezione tra la portata centrale e quelle laterali (a); campo vettoriale calcolato relativo ad una sezione presa lontano dagli ingressi laterali (b); immagine ricavata dal modello computazionale relativa alle linee di flusso della portata centrale a livello dell'intersezione del canale centrale con i due laterali (c)

In Figura 5.4 (b) si è valutata la larghezza della sezione occupata dalla portata centrale, corrispondente a circa 33,5  $\mu\text{m}$ , tale valore risulta inferiore rispetto a quello atteso dalle simulazioni computazionali (Figura 5.4 (c)) e dai calcoli analitici, nei quali il risultato ottenuto è stato pari a 37,5  $\mu\text{m}$ . Tuttavia, durante l'acquisizione dei dati di questa prova, si è dovuto effettuare un filtraggio consistente dei dati per l'eccessiva quantità di rumore sovrapposto all'immagine. Ciò potrebbe aver determinato l'eliminazione di una quantità di

dati utili che, seppur minima, avrebbe tuttavia permesso di valutare la corretta percentuale di sezione occupata dalla portata centrale.

Infine, sono stati paragonati i valori di velocità massimi in corrispondenza della sezione centrale del canale ottenuti dal software TECPLOT e dal modello computazionale. Nel primo caso, il valore della velocità massima è risultato pari a 0,258 m/s mentre nel secondo caso è risultato pari a 0,261 m/s. Differentemente da ciò che accade nelle altre prove, in questo caso si osserva una quasi totale corrispondenza tra i due valori di velocità massima. Questo può essere dovuto ad una maggiore quantità di dati disponibili per l'elaborazione di queste immagini grazie ad un ampliamento della sezione caratterizzata dalla presenza di particelle traccianti. Infatti, a parità di ingrandimento (20x), una sezione di passaggio maggiore permette di avere incrementate probabilità di individuare al suo interno particelle traccianti. I globuli rossi, d'altro canto, trovandosi anch'essi distribuiti su una sezione maggiore, comportano un disturbo inferiore ai risultati delle elaborazioni.

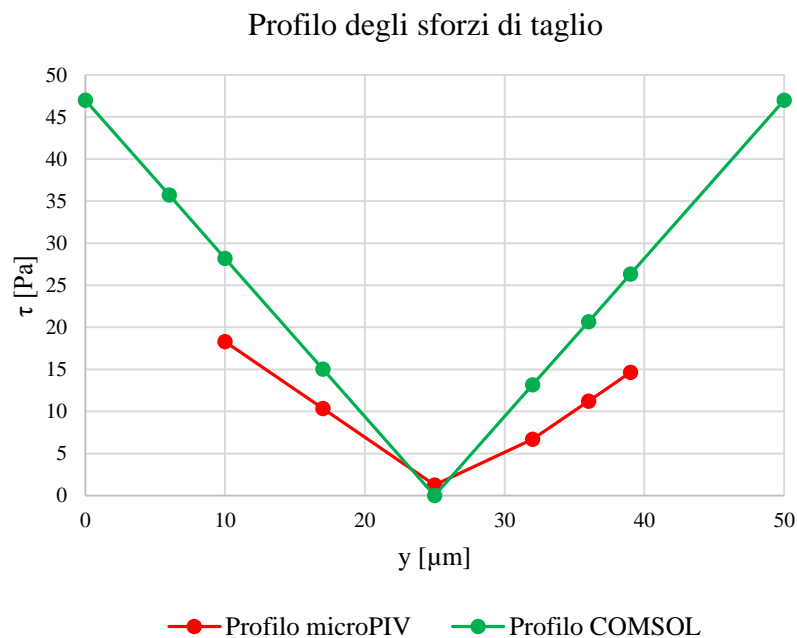
Grazie alla disponibilità maggiore di dati, è stato possibile ricavare il profilo di velocità in corrispondenza della sezione centrale del canale e confrontare tale profilo con quello ottenuto sulla base del modello computazionale. In Figura 5.5 vengono riportati con assi comuni entrambi i profili di velocità.



**Figura 5.5** - Profilo di velocità della prova  $\delta$  ricavato dai dati estratti da INSIGHT3G (rosso) e dal modello computazionale (verde)

Il profilo di velocità ottenuto dalla microPIV presenta il tipico andamento parabolico di un fluido a regime laminare, confermando le ipotesi di laminarità alla base del modello computazionale. I profili di velocità ottenuti presentano un andamento tra loro paragonabile. La velocità massima ricavata tramite la simulazione computazionale è leggermente superiore a quella estrapolata dai dati tramite INSIGHT3G. Al fine di paragonare gli andamenti dei due profili ed ottenere, dunque, un confronto quantitativo, è stato effettuato il test statistico T-test. Il p-value ricavato è stato pari a 0,91, a conferma della buona correlazione tra gli andamenti delle due parabole. Ad ulteriore conferma è stato eseguito un calcolo dello scarto percentuale medio dei valori dei punti noti appartenenti alle due parabole. Tale valore ricavato è pari a circa il 3%, valore molto basso e, dunque, indicativo di una forte correlazione tra le due parabole. L'andamento sperimentale della velocità lungo la sezione del canale è risultata dunque ottimamente approssimata dal modello computazionale.

E' stato infine valutato l'andamento dello sforzo di taglio, in corrispondenza della sezione centrale del canale, in funzione della posizione  $y$  valutata lungo la direzione trasversale al flusso. In Figura 5.6 viene riportato il confronto tra il profilo ottenuto grazie ai dati estratti da INSIGHT3G e il profilo ottenuto sulla base del modello computazionale.



**Figura 5.6** - Profilo degli sforzi di taglio della prova  $\delta$  ricavato dai dati estratti da INSIGHT3G (rosso) e dal modello computazionale (verde)

Come osservato a livello dei profili di velocità, i valori ricavati dal modello computazionale risultano maggiori rispetto a quelli ricavati sperimentalmente. Tale differenza deriva, come naturale, dalla discordanza, seppur minima, già evidenziata per i profili di velocità. Tuttavia, anche in questo caso i profili seguono un andamento tra loro paragonabile.

## **6 - CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI**

L'utilizzo di eritrociti quali vettori di farmaci costituisce un campo di ricerca in continua evoluzione. Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito dell'applicazione di sforzi di taglio sulla membrana eritrocitaria in virtù dello scorrimento di fluido all'interno di canali di dimensioni micrometriche e analizza l'efficacia della tecnica del flusso confinato in termini di incapsulamento.

Tramite il modello computazionale realizzato è stato possibile effettuare uno studio fluidodinamico implementando l'esatta geometria del microcapillare commerciale con ingressi a croce. Sono stati valutati i profili di velocità e degli sforzi di taglio, la distribuzione della fase dispersa e lo spessore della sezione occupata dalle linee di flusso provenienti dall'ingresso centrale. Sulla base di un modello di diffusione molecolare e di un criterio di selezione delle prove, sono state individuate le condizioni di lavoro ottimali relative alle prove d'incapsulamento.

L'utilizzo della  $\mu$ PIV ha permesso di valutare la reale fluidodinamica all'interno del microcapillare. E' stato verificato sperimentalmente l'avvenuto confinamento in termini di spessore della sezione occupata dalla portata centrale, dimostrando dunque come la selezione delle portate permetta di effettuare un preciso controllo sull'entità del confinamento. Tramite un confronto con i dati derivanti dalle simulazioni, è stato possibile osservare come il modello sovrastimi i risultati sperimentali, limitatamente in termini di velocità e più significativamente in termini di sforzi di taglio. Tale differenza viene attribuita alle ipotesi semplificative effettuate in fase di modellizzazione e, in particolar modo, all'aver trascurato la natura deformabile e bilobata dei globuli rossi e al non aver considerato la distribuzione eritrocitaria in canali micrometrici. Per quanto riguarda le immagini acquisite alla  $\mu$ PIV, è da rilevare come la scarsità dei dati abbia limitato il processo di analisi. I campi vettoriali estratti da TECPLOT, infatti, dopo un opportuno filtraggio, presentano una bassa densità di vettori di velocità che non permettono di definire con precisione i profili di velocità e i relativi valori medi sulla sezione. Inoltre, un ulteriore ostacolo per l'elaborazione dei dati è dovuto alla presenza dei globuli rossi in soluzione, in corrispondenza dei quali, infatti, le immagini alla  $\mu$ PIV mostrano zone nere. A fronte di tale problematica, studi precedenti

hanno evidenziato come ematocriti superiori all'1% comportino problemi di visualizzazione delle immagini. Un altro fattore critico nella corretta visualizzazione dei dati estratti dalla  $\mu$ PIV è la concentrazione di particelle traccianti in polistirene utilizzata a livello della portata centrale. L'utilizzo di un'ottica a ingrandimento 20x, necessaria a visualizzare correttamente l'area di confinamento del flusso centrale, può comportare la presenza di una ridotta quantità di particelle traccianti nella zona di acquisizione, dalla quale derivano, dunque, immagini caratterizzate dalla scarsità di vettori velocità sovrapposti a un'elevata quantità di rumore. Nel presente studio, a fronte delle percentuali di confinamento attuate e, dunque, delle ridotte sezioni di passaggio occupate dalla portata centrale, i parametri di ematocrito e di concentrazione delle particelle traccianti risultano essere ancora più critici rispetto agli studi precedenti.

In futuro, andrebbe implementato un modello computazionale in grado di simulare in maniera più approfondita la meccanica e la morfologia dei globuli rossi, al fine di garantire una maggiore fedeltà. Nel caso in cui si volesse utilizzare un modello analogo a quello presente, sarà fondamentale tenere conto del fatto che i risultati ottenuti dalle simulazioni, in termini di velocità e sforzi di taglio, sovrastimano i risultati reali. Di tale sovrastima bisognerà tener conto nell'effettuare i test sperimentali volti a verificare l'efficacia di incapsulamento ottenibile sfruttando questa tecnica.

Infine, per le future prove alla  $\mu$ PIV, si rende necessario valutare se l'utilizzo di una concentrazione maggiore di particelle traccianti in polistirene possa permettere una migliore analisi delle immagini, in modo da poter effettuare uno studio della fluidodinamica all'interno del microcapillare con una quantità consistente di dati.



# **BIBLIOGRAFIA**

## CAPITOLO 1

[1] D. U. Silverthorn, “Fisiologia, un approccio integrato”, Casa Editrice Ambrosiana, Terza Edizione, giugno 2007

[2] [www.antranik.org](http://www.antranik.org) (26/11/2014)

[3] Y. C. Fung, “Biomechanics Circulations”, Springer, Second Edition, 1997

[4] M. Piergiovanni, “Valutazione computazionale e sperimentale degli effetti della microfluidodinamica sull’incapsulamento di molecole in eritrociti”. Tesi di laurea, Scuola di Ingegneria dei Sistemi, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano, A.A. 2012-2013

[5] D. G. D’Urso, “Studio reologico del sangue in microcapillari: 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

[6] 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

[7] 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

[8] 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

- [9] 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
- [10] Maria Laura Costantino, Dispense del corso di Biomacchine, A.A. 2013-2014
- [11] G. Cianci, “Effetti emolitici della fluidodinamica del sangue in dispositivi biomedici: analisi dello stato dell’arte”. Tesi di Laurea, Dipartimento di Bioingegneria, Politecnico di Milano Anno accademico 2001-2002
- [12] Salvatore P. Suter, “Brief reviews: flow-induced trauma to blood cells”. Circulation Research Vol. 4, 1997
- [13] Robert M. Johnson, “Membrane stress increases cation permeability in red cells”. Biophysical Journal, 67:1876-1881, 1994
- [14] W.H. Reinhart, S. Chien, “Red cell rheology in stomatocyte-echinocyte transformation: roles of cell geometry and cell shape”. Blood, 67:1110-8, 1986
- [15] [www.haematologica.org](http://www.haematologica.org) (26/11/2014)
- [16] R.P. Rand, A.C. Burton, “Mechanical properties of the red cell membrane: I. membrane stiffness and intracellular pressure”. Biophys. J., 4:115-135, 1964
- [17] R.P. Rand, “Mechanical properties of the red cell membrane. II. Viscoelastic breakdown of the membrane”. Biophys. J., 4:303-316, 1964
- [18] M. Rae Comps et al., “Technical Manual”, Edizioni AABB, 16° edizione, 2008

## CAPITOLO 2

- [1] Sara Biagiotti, Maria Filomena Paoletti, Alessandra Fraternali, Luigia Rossi and Mauro Magnani, "Drug delivery by red blood cells". *IUBMB Life*, 63:621-631, 2011
- [2] F. Pierigè, S. Serafini, L. Rossi, M. Magnani, "Cell-based drug delivery". *Advanced drug delivery reviews*, 60:286-295, 2008
- [3] V.R. Muzykantov, "Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by Mother Nature". *Expert Opin Drug Deliv.*, 7:403-427, 2010
- [4] C. Cinti, M. Taranta, I. Naldi, S. Grimaldi, "Newly engineered magnetic erythrocytes for sustained and targeted delivery of anti-cancer therapeutic compounds". *Engineered Magnetic Erythrocytes Delivery System*, 6(2), 2011
- [5] M. Hamidi, H. Tajerzadeh, A.R. Dehpour, M.R. Rouini, "In vitro characterization of human intact erythrocytes loaded by enalaprilat". *Drug Delivery*, 8:223-230, 2001
- [6] M. Hamidi, H. Tajerzadeh, "Carrier erythrocytes: an overview". *Drug Delivery*, 10:9-20, 2003
- [7] M. Magnani, M. Bianchi, L. Rossi, V. Stocchi, "Human red blood cells as bioreactors for the release of 2',3'-dideoxycytidine, an inhibitor of HIV infectivity". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 164:446-452, 1989
- [8] Rongcong Luo, Shailender Mutukumaraswamy, Subbu S. Venkatraman, Bjoörn Neu, "Engineering of erythrocyte-based drug carriers: control of protein release and bioactivity". *J Mater Sci: Mater Med*, 23:63-71, 2012
- [9] J.C. Weaver, G.I. Harrison, J.G. Bliss, J.R. Mourant, K.T. Powell, "Electroporation: high frequency of occurrence of a transient high-permeability state in erythrocytes and intact yeast. *FEBS Letters*, 229:30-34, 1988
- [10] J. Gehl, "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research". *Acta Physiol Scand.*, 177:437-447, 2003
- [11] J.C. Weaver, "Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues"; *J Cell Biochem.*, 51:426-35, 1993

- [12] M. Magnani, "Erythrocyte engineering for drug delivery and targeting". *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 28:1-6, 1998
- [13] C.G. Millán, A.Z. Castañeda, M.L. Marinero, J.M. Lanao, "Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers". *Journal of controlled release*, 95:27-49, 2004
- [14] G.V. Shavi, R.C. Doijad, P.B. Deshpande, F.V. Manvi, S.R. Meka, N. Udupa, R. Omprakash, K. Dhirendra, "Erythrocytes as carrier for prednisolone: in vitro and in vivo evaluation". *Pak. J. Pharm. Sci.*, 23:194-200, 2010
- [15] C.G. Millán, A.Z. Castañeda, M.L. Marinero, J.M. Lanao, "Factors associated with the performance of carrier erythrocytes obtained by hypotonic dialysis". *Blood cells, molecules and diseases*, 33:132-140, 2004
- [16] Rongcong Luo, Shaillender Mutukumaraswamy, Subbu S. Venkatraman, Bjo'rn Neu, "Engineering of erythrocyte-based drug carriers: control of protein release and bioactivity". *J Mater Sci: Mater Med*, 23:63-71, 2012
- [17] S. Noel-Hocquet, S. Jabbouri, S. Lazar, J.C. Maunier, G. Guillaumet, C. Ropars, "Erythrocytes as carriers of new anti-opioid prodrugs: in vitro studies". *Advances in experimental medicine and biology*, 326:215-221, 1992
- [18] 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
- [19] 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*, 154:306-313, 2011
- [20] H.J. Kirch, C. Sheffield, J.R. DeLoach, "Susceptibility of carrier erythrocytes to a natural hemolytic system". *Advances in experimental medicine and biology*, 326:341-345, 1992
- [21] M. Piergiovanni, "Valutazione computazionale e sperimentale degli effetti della microfluidodinamica sull'incapsulamento di molecole in eritrociti". Tesi di laurea, Scuola

di Ingegneria dei Sistemi, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano, A.A. 2012-2013

[22] 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

[23] 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

[24] D. Cortinovis, “Modello reologico del moto degli eritrociti in microcanali per ottimizzare l’incapsulamento di molecole probanti”. Tesi di Laurea, Scuola di Ingegneria dei Sistemi, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano, A.A. 2012-2013

[25] D. G. D’Urso, “Studio reologico del sangue in microcapillari: 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

[26] 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

[27] X. Xuan, J. Zhu, C. Church, “Particle focusing in microfluidic devices”. *Microfluid. Nanofluid.*, 9:1-16, 2010

[28] G.E.I. Harisa, M.F. Ibrahim, F.K. Alanazi, “Characterization of human erythrocytes as potential carrier for pravastatin: an in vitro study”. *Int. J. Med. Sci.*, 8:222-23, 2011

## CAPITOLO 3

- [1] M. Piergiovanni, “Valutazione computazionale e sperimentale degli effetti della microfluidodinamica sull’incapsulamento di molecole in eritrociti”. Tesi di laurea, Scuola di Ingegneria dei Sistemi, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano, A.A. 2012-2013
- [2] 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
- [3] 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
- [4] 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
- [5] D. G. D’Urso, “Studio reologico del sangue in microcapillari: 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
- [6] D. Cortinovis, “Modello reologico del moto degli eritrociti in microcanali per ottimizzare l’incapsulamento di molecole probanti”. Tesi di Laurea, Scuola di Ingegneria dei Sistemi, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano, A.A. 2012-2013
- [7] Rui Lima, Shigeo Wadac, Motohiro Takeda, Ken-ichi Tsubota, Takami Yamaguchi, “In vitro confocal micro-PIV measurements of blood flow in a square microchannel: the effect of the haematocrit on instantaneous velocity profiles”. *Journal of Biomechanics*, 40:2752-2757, 2007

- [8] Rui Lima, Shigeo Wada, Shuji Tanaka, “In vitro blood flow in a rectangular PDMS microchannel: experimental observations using a confocal micro-PIV system”. *Biomed Microdevices*, 10:153-167, 2008
- [9] C.D. Meinhart, S.T. Wereley, J.G. Santiago, “PIV measurements of a microchannel flow”. *Experiments in Fluids*, 27:414-419, 1999
- [10] L. Bitschl, L.H. Olesen, C.H. Westergaard, H. Bruus, H. Klank, J.P. Kutterl, “MicroPIV on blood flow in a microchannel”. 7th International Conference of Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems, October 2003, Squaw Valley, California USA
- [11] C.P. Poelma, Vennemann R. Lindken, “In vivo blood flow and wall shear stress measurements in the vitelline network”. *Exp Fluids*, 45:703-713, 2008
- [12] Yasuhiko Sugii, Shigeru Nishio, Koji Okamoto, “In vivo PIV measurement of red blood cell velocity field in microvessels considering mesentery motion”. *Physiol. Meas.*, 23:403-416, 2002
- [13] [www.microfluidics.stanford.edu](http://www.microfluidics.stanford.edu) (08/01/2015)
- [14] Steven T. Wereley, Carl D. Meinhart, “Recent advances in micro-Particle Image Velocimetry”. *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 42:557-76, 2010
- [15] “Theory of Operations, PIV Manual”. Revised 1999
- [16] D. Francis, T.O.H. Charrett, L. Waugh, R.P. Tatam, “Objective speckle velocimetry for autonomous vehicle odometry”. *Applied Optics*, 16:3478-3490, 2012

# APPENDICE

## I - Modello computazionale - “Coppie sforzo - tempo”

Ia - Ht = 1%

% Confinamento	Q <sub>centrale</sub> [μL/min] - Q <sub>dx</sub> [μL/min] - Q <sub>sx</sub> [μL/min]	t <sub>pass</sub> [s]	τ [Pa]
25%	6 - 9 - 9	0,51	26,19
	4 - 6 - 6	0,76	17,45
	2 - 3 - 3	1,52	8,73
50%	14 - 7 - 7	0,43	31,42
	10 - 5 - 5	0,61	22,43
	5 - 2,5 - 2,5	1,21	11,22
75%	21 - 3,5 - 3,5	0,43	32,9
	14 - 2,3 - 2,3	0,65	21,83
	7 - 1,17 - 1,17	1,3	10,96



Ib - Ht = 5%

% Confinamento	Q <sub>centrale</sub> [μL/min] - Q <sub>dx</sub> [μL/min] - Q <sub>sx</sub> [μL/min]	t <sub>pass</sub> [s]	τ [Pa]
25%	25 - 37,5 - 37,5	0,12	126,02
	15 - 22,5 - 22,5	0,2	75,36
	2 - 3 - 3	1,52	11,06
50%	40 - 20 - 20	0,15	104,37
	25 - 12,5 - 12,5	0,24	65,9
	10 - 5 - 5	0,6	27,15
75%	60 - 10 - 10	0,15	109,47
	40 - 6,67 - 6,67	0,23	73,52
	20 - 3,3 - 3,3	0,46	37,47

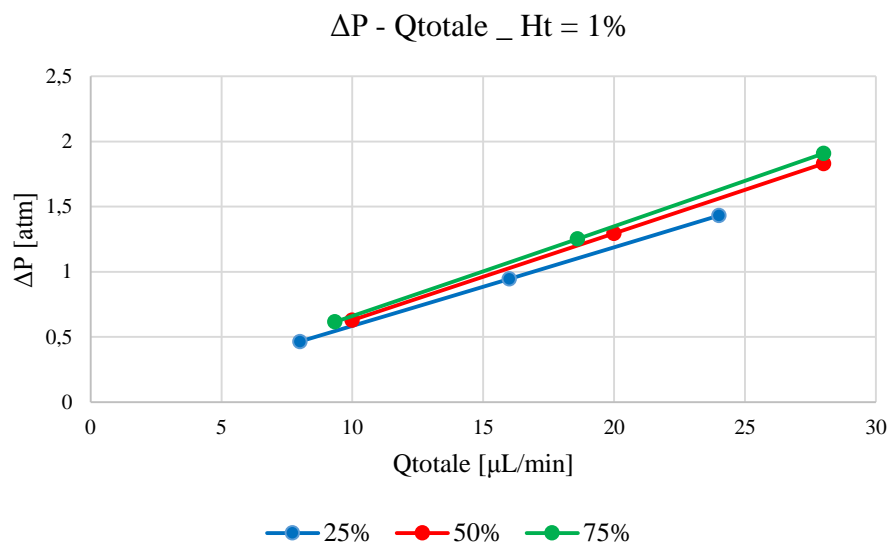
Ic - Ht = 10%

% Confinamento	Q <sub>centrale</sub> [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ] - Q <sub>dx</sub> [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ] - Q <sub>sx</sub> [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	t <sub>pass</sub> [s]	$\tau$ [Pa]
25%	33 - 49,5 - 49,5	0,09	194,07
	25 - 37,5 - 37,5	0,12	147,93
	17 - 25,5 - 25,5	0,18	101,68
50%	66 - 33 - 33	0,09	200,53
	44 - 22 - 22	0,14	134,9
	22 - 11 - 11	0,28	69
75%	80 - 13,33 - 13,33	0,11	170,98
	66 - 11 - 11	0,14	135,41
	33 - 5,5 - 5,5	0,28	72,31

## II - Modello computazionale - “Perdite di carico”

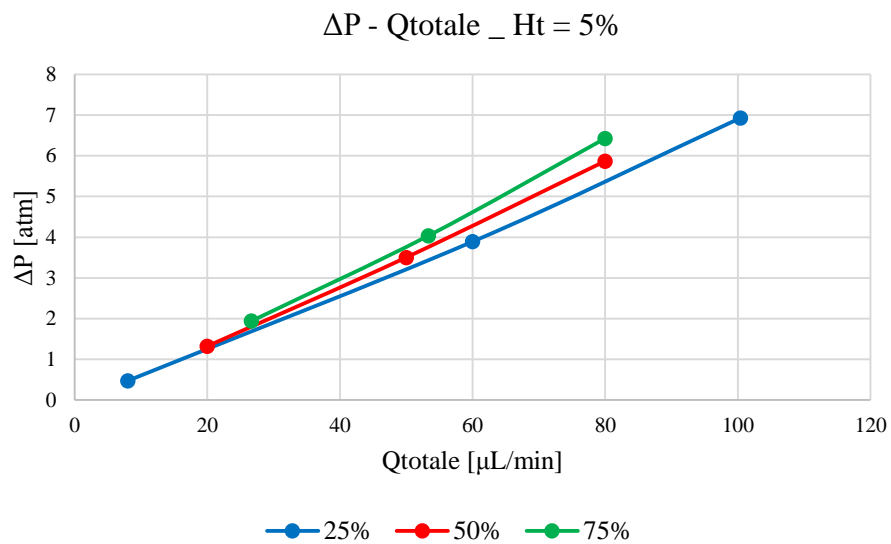
IIa - Ht = 1%

$Q_{\text{totale}}$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	$\Delta P$ [Pa]	$\Delta P$ [atm]
8	47082	0,465
16	95767	0,945
24	145029	1,431
10	63727	0,629
20	131196	1,295
28	185451	1,83
9.34	62308	0,615
18.6	126802	1,251
28	193379	1,908



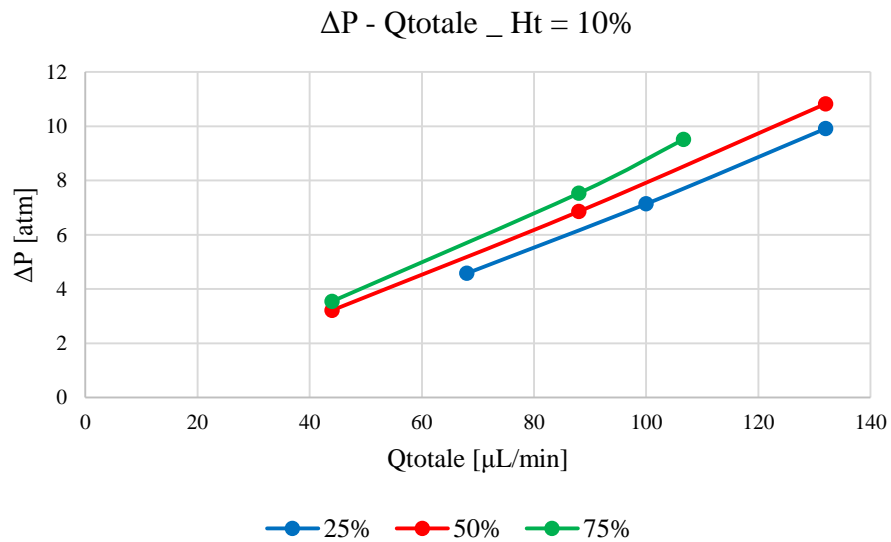
IIb - Ht = 5%

$Q_{\text{totale}} [\mu\text{L}/\text{min}]$	$\Delta P [\text{Pa}]$	$\Delta P [\text{atm}]$
8	47806	0,472
60	394291	3,891
100,4	702286	6,931
20	133849	1,321
50	355014	3,504
80	594884	5,871
26,66	196544	1,939
53,34	409041	4,037
80	651478	6,429



IIc - Ht = 10%

$Q_{\text{totale}} [\mu\text{L}/\text{min}]$	$\Delta P [\text{Pa}]$	$\Delta P [\text{atm}]$
68	463862	4,578
100	723264	7,138
132	1004730	9,916
44	325880	3,216
88	695130	6,86
132	1097287	10,829
44	359538	3,548
88	763284	7,533
106,66	964319	9,517



### III - Modello computazionale - “Numeri di Reynolds”

% Confinamento	Ht = 1%		Ht = 5%		Ht = 10%	
	Q [ $\mu$ L/min]	Re	Q [ $\mu$ L/min]	Re	Q [ $\mu$ L/min]	Re
25%	6 - 9 - 9	6,56	25 - 37,5 - 37,5	24,89	33 - 49,5 - 49,5	28,63
	4 - 6 - 6	4,39	15 - 22,5 - 22,5	14,73	25 - 37,5 - 37,5	21,71
	2 - 3 - 3	2,18	2 - 3 - 3	1,97	17 - 25,5 - 25,5	14,72
50%	14 - 7 - 7	7,74	40 - 20 - 20	19,99	66 - 33 - 33	28,74
	10 - 5 - 5	5,53	25 - 12,5 - 12,5	12,48	44 - 22 - 22	19,16
	5 - 2,5 - 2,5	2,76	10 - 5 - 5	5,00	22 - 11 - 11	9,57
75%	21 - 3,5 - 3,5	7,76	60 - 10 - 10	20,16	80 - 13,33 - 13,33	23,24
	14 - 2,3 - 2,3	5,16	40 - 6,67 - 6,67	13,38	66 - 11 - 11	19,25
	7 - 1,17 - 1,17	2,58	20 - 3,3 - 3,3	6,70	33 - 5,5 - 5,5	9,63