

Università degli Studi di Napoli Federico II



**DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA CHIMICA
XX CICLO**

ANALISI DELLA DEFORMABILITA' DI GLOBULI ROSSI DURANTE IL FLUSSO IN MICROCAPILLARI

TESI DI DOTTORATO

Tutor:

Prof. Stefano Guido

Candidato:

Ing. Luca Lanzaro

Comitato Scientifico:

Prof. Giuseppe Marrucci

Prof. Bruno Rotoli

Ing. Marino Simeone

... a Luigi, Marino, Sergio, Stefano e Vincenzo

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 Il sangue umano	pag. 6
1.1.1. Proprietà e caratteristiche	pag. 6
1.1.2 Emoreologia ed Emofluidodinamica	pag. 10
1.1.3 Deformabilità degli eritrociti	pag. 22
1.2 Particolari patologie eritrocitarie	pag. 27
1.3 Stato dell'arte clinico	pag. 28
1.4 Stato dell'arte scientifico	pag. 31
1.5 Sistemi Modello	pag. 40
1.6 Motivazione ed obiettivi	pag. 52

2 MATERIALI E METODI

2.1 Conservazione degli eritrociti e proprietà della soluzione fisiologica	pag. 56
2.2 Capillari in gel d'agarosio	pag. 58
2.2.1 Proprietà dell'agarosio e preparazione del gel	pag. 60
2.2.2 La cella di flusso per capillari in gel di agarosio	pag. 60
2.2.3 Creazione dei microcapillari	pag. 65
2.3 Capillari di silica	pag. 68
2.3.1 La cella di flusso per capillari di silica	pag. 68
2.4 Apparato sperimentale 1: analisi del flusso eritrocitario	pag. 71
2.4.1 Generazione del flusso eritrocitario in microcapillari	pag. 73
2.4.2 Acquisizione ed analisi delle immagini (Apparato Sperimentale 1)	pag. 75
2.5 Fluidi utilizzati come sistema modello	pag. 81

2.5.1 Modalità di preparazione dei fluidi	pag. 82
2.5.2 Caratterizzazione reologica dei campioni	pag. 84
2.5.2.1 Metodi di misura	pag. 84
2.5.2.2 Elaborazione dati	pag. 87
2.6 Apparato sperimentale 2: analisi del sistema modello	pag. 88
2.6.1 Apparecchiatura a Piatti Paralleli	pag. 88
2.6.2 Video microscopia ottica	pag. 94
2.6.3 Caricamento del materiale in caso di flusso di shear semplice	pag. 96
2.6.4 Generazione del flusso di shear semplice	pag. 99
2.6.5 Generazione del flusso in microcapillari	pag. 100
2.6.6 Acquisizione ed analisi delle immagini (Apparato sperimentale 2)	pag. 103
3. RISULTATI	
3.1 Analisi <i>in vitro</i>	pag. 106
3.1.1 Analisi di globuli rossi in condizioni statiche	pag. 106
3.1.2 Flusso di globuli rossi in capillari di agar di 50 μm	pag. 108
3.1.3 Flusso di eritrociti sani in capillari di agar di 5 μm	pag. 110
3.2 Flusso di globuli rossi patologici in capillari di agar di 5 μm	pag. 113
3.3 Velocità di globuli rossi in capillari di silica	pag. 115
3.4 Flusso eritrocitario in capillari di silica di 100 μm	pag. 122
3.5 Analisi di un sistema modello	pag. 125
3.5.1 Caratterizzazione reologica	pag. 127
3.5.2 Calcolo tensione interfacciale	pag. 128
3.6 Tipologia 1: Flusso di shear semplice	pag. 131
3.6.1 Analisi morfologica	pag. 132
3.6.2 Piccole deformazioni (bassi Ca)	pag. 134

3.6.3 Alte deformazioni (alti Ca)	pag. 138
3.6.4 Effetti sulla stabilità in flusso	pag. 139
3.6.5 Cinetiche di Break-up	pag. 143
3.7 Tipologia 2: Flusso di scorrimento in microcapillari	pag. 145
3.7.1 Start-up di deformazione	pag. 145
3.7.2 Analisi morfologica	pag. 153
3.7.3 Campo di moto	pag. 158
3.7.4 Break-up	pag. 167
4. CONCLUSIONI	pag. 169
5. BIBLIOGRAFIA	pag. 171

1. Introduzione

1.1 Il sangue umano

1.1.1. Proprietà e caratteristiche

Il sangue è un tessuto biologico allo stato fluido, viscoso, di colore rosso, opaco. La funzione più importante del sangue è quella di trasportare e distribuire a tutti gli organi e tessuti del corpo le sostanze necessarie alle diverse attività metaboliche cellulari e di asportarne i prodotti di rifiuto del metabolismo destinati ad essere eliminati. Oltre alle sostanze nutritive e ai metaboliti trasporta anche i gas respiratori (ossigeno e anidride carbonica, presenti nella fase ematica della respirazione).

Svolge, inoltre, importanti funzioni nel mantenimento delle caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente interno fra cui si ricordano:

- ✓ **la regolazione di PH e la composizione elettrolitica** dei liquidi interstiziali in ogni parte del corpo;
- ✓ **la riduzione di perdite liquide** dovute a danneggiamento di vasi o tessuti. Le reazioni di coagulazione bloccano le interruzioni nelle pareti vascolari prevenendo modificazioni nel volume del sangue che possono intaccare seriamente la funzione cardiovascolare;
- ✓ **la difesa del corpo da microrganismi estranei ed altri organismi patogeni** tramite gli anticorpi ed i globuli bianchi che migrano nei tessuti infetti per distruggere in loco le cause di infezione;

✓la **termoregolazione** mantenendo costante la temperatura nelle diverse parti del corpo.

La sua composizione consta di una parte costituita da una sospensione di cellule comunemente detti **elementi figurati** suddivisibili in *globuli rossi* o eritrociti, *globuli bianchi* o leucociti e *piastrine* immersi in una soluzione salina detta **plasma**, contenente numerose molecole inorganiche dal basso peso molecolare e circa il 7% di proteine fra cui le più importanti sono il *fibrinogeno*, l'*albumina* e la *globulina*.

Per lo studio della reologia e della fluidodinamica sanguigna l'unico componente di notevole importanza sono gli eritrociti a causa della loro forte concentrazione: rappresentano infatti il 40-50% circa del volume totale e sono presenti in numero di 5 milioni in ogni mm³. Tale quantità è decisamente superiore a quella dei globuli bianchi, presenti nella misura di circa uno ogni 1000 eritrociti, e delle piastrine (circa 50-100 ogni 1000 globuli rossi), ove però il volume di quest'ultime è relativamente esiguo (Tabella 1)

elementi	diametro (in μm)	numero (per mm^3)	principali funzioni
 globuli rossi	7-8	4 500 000 5 500 000	trasporto di ossigeno
 globuli bianchi	9-12	7 000 10 000	difesa contro i microrganismi
 piastrine	2-4	300 000 (notevoli variazioni)	coagulazione del sangue

Tabella 1: Confronto tra alcune caratteristiche degli elementi corpuscolari del sangue.

I globuli rossi sono elementi specializzati nella funzione di trasporto ai tessuti dell'ossigeno assunto con la respirazione, e questa

funzione dipende dal loro contenuto di *emoglobina* (Figura 1), una proteina composta da 4 catene globiniche ognuna delle quali legata ad un gruppo prostetico definito *eme* (un gruppo chimico contenente atomi di ferro), che può legarsi ad una molecola di ossigeno o di anidride carbonica a seconda del pH dell'ambiente circostante.

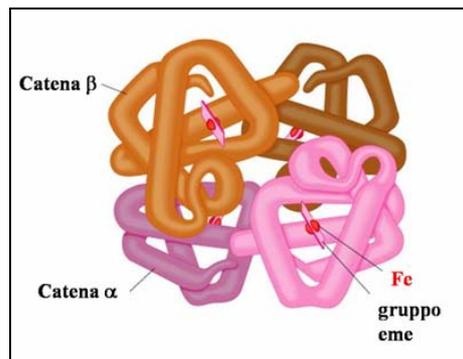


Figura 1: Emoglobina.

Come già detto l'emoglobina provvede allo scambio di ossigeno con i tessuti periferici, dai quali viene impiegato nei loro processi metabolici (respirazione ed altre attività cellulari).

L'emoglobina è presente, in condizioni normali, nella misura di 15 g ogni 100 ml di sangue e a questa è dovuto il colore rosso del sangue. La capacità dell'emoglobina di legarsi all'ossigeno è reversibile ed il suo contenuto, in condizioni normali, alla pressione di 760 mmHg (1 atm) di saturazione in acqua ed alla temperatura di 37°C, permette il trasporto di 20 ml di ossigeno (Merrill et al, 1961) mentre per il plasma detto valore vale soltanto 0,3 ml. I globuli rossi (Figura 2) vengono continuamente formati, nel midollo spinale, a partire da cellule progenitrici attraverso un processo di maturazione e di differenziazione cellulare che in condizioni definitive di sviluppo ha luogo nel midollo osseo.

La loro vita media è di circa 120 giorni. Ogni giorno circa l'0,8% del numero degli eritrociti viene distrutto, soprattutto a livello della milza, dove vengono riciclati per produrre altre proteine. La maggior parte ritorna al midollo osseo per assemblare altri globuli rossi.

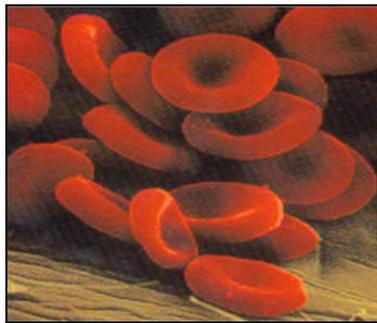


Figura 2: Globuli rossi.

Queste cellule divengono più fragili con l'età e la loro distruzione avviene tramite frammentazione o fagocitosi da parte di altre cellule specializzate (in prevalenza globuli bianchi).

I globuli rossi maturi sono privi di nucleo, quindi di DNA nucleare e di mitocondri, e sono formati solo da una membrana plasmatica che racchiude l'emoglobina e un numero limitati di enzimi, necessari per il mantenimento dell'integrità della membrana e per la funzione di trasporto dei gas. Hanno forma schiacciata, biconcava del diametro medio di 7,5 μm e spessore di 3 μm , con densità pari a 1,08 g/ml.

La caratteristica forma con una depressione al centro (Figura 3), dovuta alla perdita del nucleo, aumenta il rapporto superficie/volume e migliora l'efficienza degli scambi gassosi.

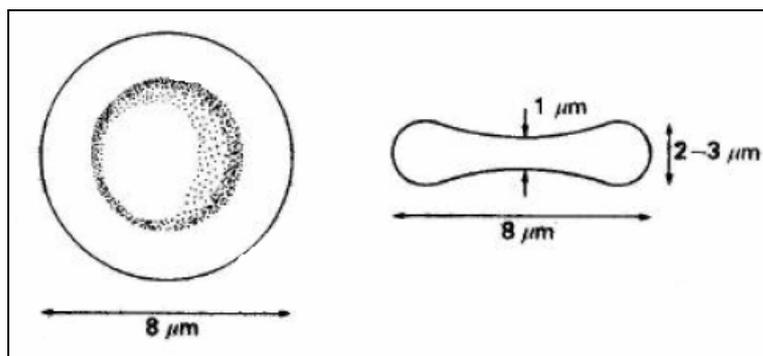


Figura 3: Forma e dimensioni di un eritrocita umano sano.

1.1.2 Emoreologia ed Emofluidodinamica

Le proprietà reologiche del sangue rivestono un importante ruolo nella regolazione del flusso sanguigno nella micro e macrocircolazione.

Le misure delle caratteristiche viscosimetriche del plasma richiedono anzitutto che quest'ultimo venga separato dalle altre componenti del sangue. Ciò si ottiene inducendo la sedimentazione delle particelle sospese per effetto gravitazionale o per effetto centrifugo. Per evitare il meccanismo di coagulazione che si verifica non appena il sangue viene rimosso da un organismo vivente, è necessario aggiungere un anticoagulante, che diluisce il sangue modificando in qualche misura la viscosità del plasma e riducendo l'*ematocrito*, cioè la concentrazione volumetrica di eritrociti nel sangue.

Il sangue intero è costituito dal 55% di plasma e dal 45% di elementi figurati (Figura 4).

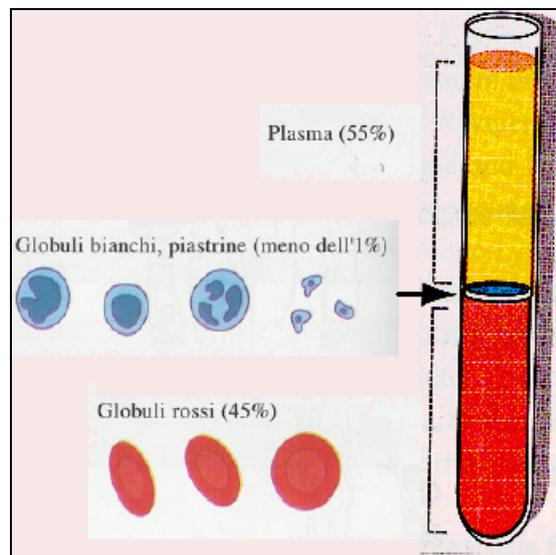


Figura 4: Campione di sangue dopo la centrifugazione.

Il plasma umano è una sostanza trasparente, lievemente giallognola, con densità relativa pari a 1,035 (Merrill et al., 1961). Si tratta di un fluido newtoniano con viscosità di circa 1,2-1,9 centipoise, quindi circa 1,2-1,9 volte più viscoso dell'acqua a 20°C, e questo è dovuto alla presenza della componente proteica del plasma.

La viscosità del sangue è ottenuta sommando la viscosità della frazione volumetrica (quindi l'ematocrito) con la viscosità del plasma:

$$\eta_{tot} = \eta_{RBC} + \eta_{plasma}$$

Essa aumenta all'aumentare dell'ematocrito ed è fortemente influenzata da tre fattori:

- **frazione volumetrica di RBC:** con l'aumentare della frazione volumetrica di RBC la viscosità della sospensione aumenta;

- **formazione di rouleaux**: l'aggregazione dei globuli rossi comporta un aumento della viscosità del sangue;
- **deformabilità delle cellule**: nelle sospensioni la viscosità aumenta con il diminuire della deformabilità dei globuli rossi (Schmid-Schonbein et al., 1969; Chien, 1977).

La relazione tra la frazione volumetrica e la viscosità non è lineare (Figura 5), infatti quest'ultima cresce rapidamente per valori dell'ematocrito > 45%.

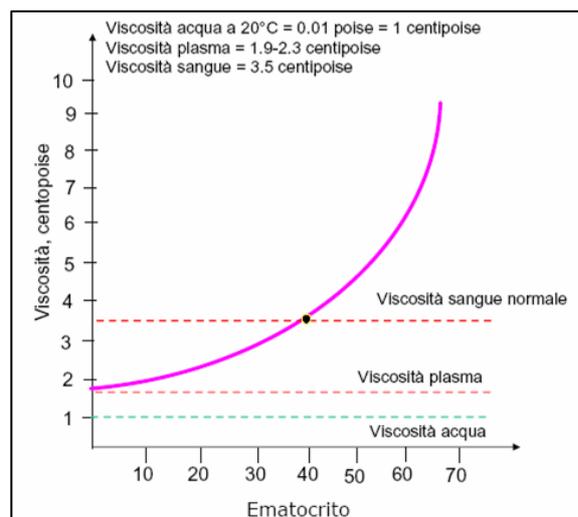


Figura 5: Effetto dell'ematocrito sulla viscosità del sangue.

L'aumento di viscosità (per esempio nella policitemia) determina un aumento della resistenza al flusso, con conseguente aumento del lavoro cardiaco. Viceversa nelle anemie la viscosità tende a ridursi. Il comportamento reologico del sangue, essendo non-newtoniano, non può essere descritto da un singolo valore di viscosità.

In un esperimento in cui viene misurata la viscosità in funzione dello shear-rate (velocità di deformazione) troveremo che a basse sollecitazioni di taglio la viscosità apparente (definita come

$$\eta_a = \frac{\pi \Delta p D^4}{128 QL}$$

) è più alta e diminuisce con l'aumento della velocità

di deformazione tendendo ad un valore costante (Figura 6).

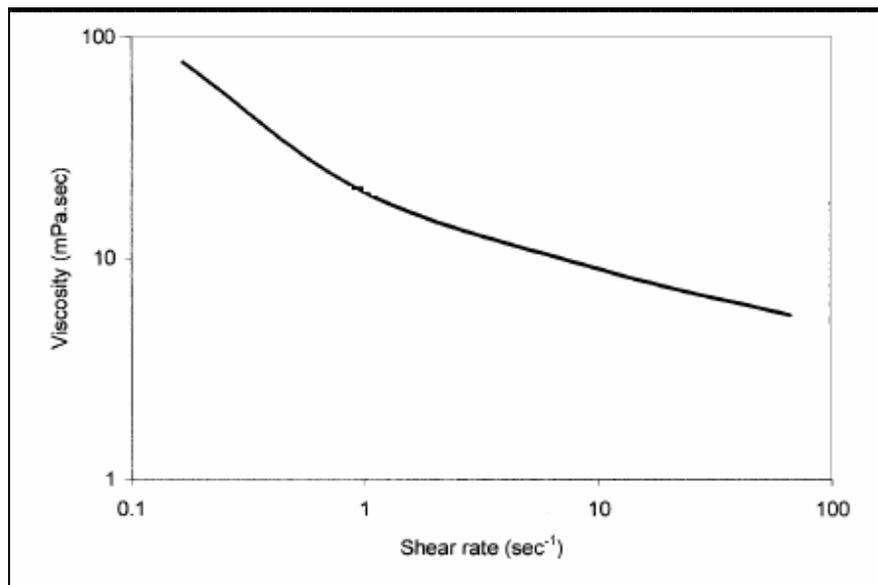


Figura 6: Andamento della viscosità vs shear-rate del sangue intero.

Per valori elevati della velocità di deformazione, tipicamente compresi nell'intervallo 50 – 100 s⁻¹, il sangue può ragionevolmente assumersi newtoniano essendo la viscosità apparente praticamente costante. Ad alte velocità di deformazioni superiore a 100 – 200 s⁻¹, la viscosità del sangue normale, misurata a 37 °C, è circa 4 a 5 cP ed è relativamente insensibile ad ulteriori accrescimenti di deformazione. I valori nominali per la viscosità del sangue normale sono circa 10 cP a 10 s⁻¹, 20 cP a 1 s⁻¹ e 100 cP a 0,1 s⁻¹.

Così, a più basse velocità di deformazione, la viscosità del sangue diventa estremamente sensibile al decremento delle forze di

deformazione esibendo il classico comportamento pseudoplastico. Questo comportamento può essere interpretato assumendo che il sangue si comporti come un sistema strutturato debole, per cui all'aumentare della velocità di deformazione, il materiale si destruttura diminuendo così la sua viscosità.

Infatti, il carattere non-newtoniano del sangue per valori sufficientemente bassi della velocità di deformazione è da attribuirsi in parte alla formazione di *rouleaux*, cioè sequenze di eritrociti che aderiscono l'uno all'altro. E' stato osservato al microscopio, utilizzando un viscosimetro a cono e piatto trasparente, che la lunghezza media dei *rouleaux* nel sangue decresce al crescere della velocità di deformazione fino a scomparire. A tale comportamento è associata una riduzione della viscosità apparente.

La presenza di una microstruttura, per quanto debole, viene associata ad uno *yield-stress*, cioè ad uno sforzo minimo richiesto per mettere in moto il liquido. I fluidi newtoniani non posseggono *yield-stress* e appena si applica loro una forza, per quanto piccola essa sia, iniziano a muoversi. L'importanza dello *yield-stress* è data dal fatto che, nei distretti circolatori ove il flusso a volte si arresta, si deve vincere lo *yield-stress* affinché il sangue possa di nuovo fluire.

Il sangue in movimento lungo un vaso è classicamente caratterizzato da un insieme di lamine fluide che scivolano una sopra l'altra con velocità gradualmente crescente dalla parete vasale all'asse centrale del lume (Figura 7).

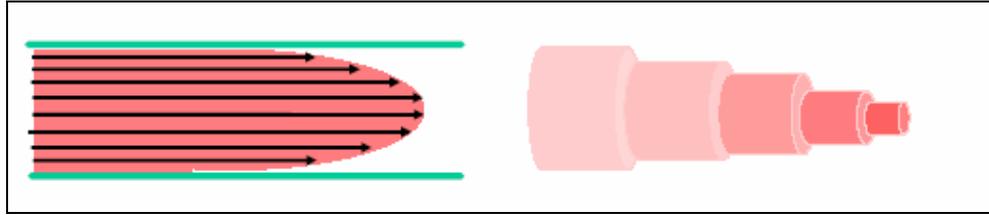


Figura 7: Moto laminare.

Poiché la differenza di velocità tra le lamine è massima alla parete vasale, *shear-rate* e *shear-stress* sono massimi in vicinanza dello strato endoteliale (tessuto connettivo), che costituisce il ricoprimento endoluminale (parete interna) del vaso sanguigno.

Il comportamento del sangue può essere descritto tramite un modello reologico, simile a quello di Bingham

$$\left\langle \begin{cases} \tau = \tau_0 + \kappa \dot{\gamma} & \text{se } \tau > \tau_0 \\ \dot{\gamma} = 0 & \text{se } \tau < \tau_0 \end{cases} \right\rangle^*$$

abbinato al modello di Casson ($\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_y} + \sqrt{\eta \dot{\gamma}}$)* che ha lo shear-stress e una parte a plateau newtoniano. Questo modello però si applica solo al flusso di shear.

Se ci mettiamo nel flusso di un tubo (Figura 8), la presenza di uno sforzo di taglio genera un profilo che ha una zona centrale dove il flusso è sostanzialmente a pistone.

* Dove τ è lo shear-stress (sforzo tangenziale), τ_0 rappresenta lo sforzo iniziale, $\dot{\gamma}$ è lo shear-rate (velocità di deformazione). Nel modello di Casson, τ_y è una costante che rappresenta lo yield-stress ed η è la viscosità.

Lo sforzo ha un andamento lineare: è massimo alla parete e si annulla a zero.

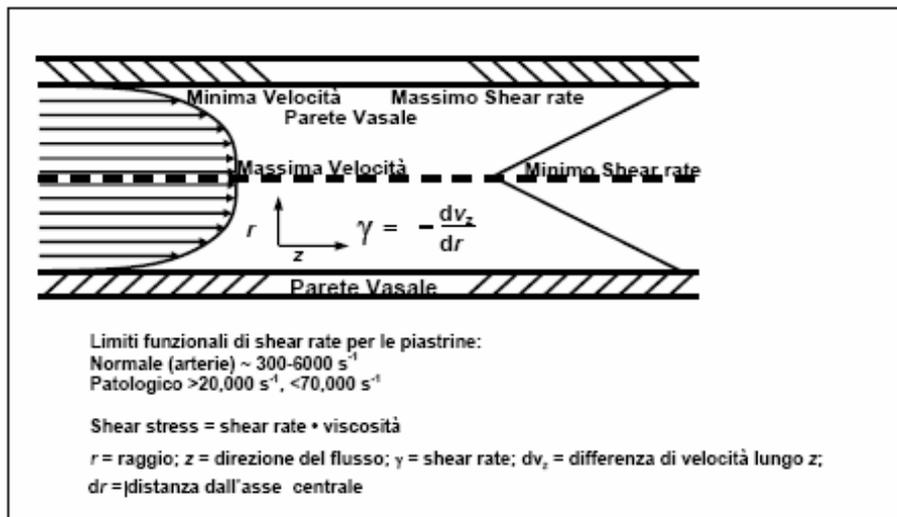


Figura 8: Rappresentazione schematica delle caratteristiche del flusso arterioso.

Da un punto di vista strettamente fluidodinamico, si possono approssimare i vasi sanguigni a delle tubazioni cilindriche: le leggi dell'idrostatica e dell'idrodinamica permettono di comprendere i principi fisici che sono alla base del funzionamento del sistema cardiovascolare, anche se le caratteristiche particolari di questo sistema non permettono una descrizione quantitativa precisa.

Il bilancio di forze quando siamo in un condotto cilindrico e prendiamo come volume di controllo un altro cilindretto coassiale (Figura 9) segue la legge di Stokes:

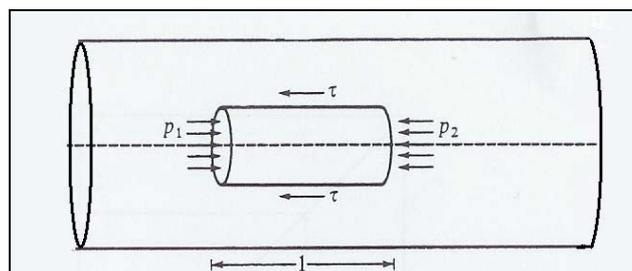


Figura 9: Flusso costante in un tubo cilindrico circolare.

la differenza di pressione (Δp) tra le due facce diviso la lunghezza (L) deve essere bilanciata dallo sforzo (τ) che agisce sulla superficie laterale

$$\tau = \frac{r}{2} \frac{\Delta p}{L}$$

Lo sforzo decresce linearmente con il raggio (r) e può arrivare ad un valore critico, *yield-stress*, dopo il quale non scorre più come un liquido, ma come se la forza spingente fosse un pistone, abbiamo quindi un profilo di velocità che si appiattisce.

Il sistema cardio-circolatorio presenta, come già detto in precedenza:

- condotti elastici e non rigidi;
- tratti (capillari) che consentono la fuoriuscita e l'ingresso di liquido;
- una pompa con attività intermittente a ritmo variabile;
- variazioni della pressione esterna ai condotti da distretto a distretto e da momento a momento, variazioni che, essendo i condotti elastici, modificano il calibro del condotto; il sangue, inoltre, non è un fluido newtoniano.

La legge che descrive il flusso attraverso tubi cilindrici, valida per flusso laminare e stazionario di un liquido omogeneo in un tubo rigido, è la legge di Poiseuille. Questa, valida per liquidi in moto laminare, fornisce il legame tra la caduta di pressione ai capi di una data condotta e la corrispondente portata:

$$Q = \frac{\pi \Delta p R^4}{8 \eta L}$$

La differenza di pressione (Δp) tra le due facce del cilindro è direttamente proporzionale alla viscosità del sangue (η) e alla lunghezza (L) del cilindro e inversamente proporzionale alla 4° potenza del raggio (R) del tubo.

Tuttavia le condizioni di flusso nel sistema vascolare sono, come si è appena visto, diverse:

- Nella maggior parte dei vasi il flusso non è stazionario ma pulsatile;
- L'albero circolatorio è ramificato;
- Essendo i vasi elastici, il diametro dei vasi può variare al variare della pressione;
- Il sangue costituisce una sospensione di corpuscoli in un liquido, risultando essere un liquido eterogeneo e non newtoniano.

Per mantenere il moto del flusso sanguigno occorre che il cuore compensi le perdite di carico dovute alle forze viscosive del sangue.

Tra i vari studi condotti nel caso di un moto in un tubo, Reynolds fece un esperimento in cui alimentava il tubo con un fluido che aveva una certa portata imposta e con una siringa immetteva un tracciante colorato (Figura 10).

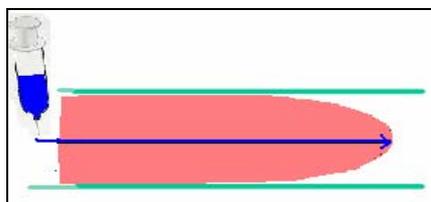


Figura 10: Immissione del tracciante nel sangue con flusso laminare.

All'aumentare della portata si arriva a un certo punto ad avere un aumento della velocità caratteristica e conseguente aumento del numero di Reynolds.

$$\text{Re} = \frac{\rho V D}{\eta}$$

dove ρ è la densità del fluido, V la velocità del flusso, D è una costante caratteristica ed η è la viscosità del sistema.

Quando le forze d'inerzia diventano sempre più predominanti rispetto alle forze viscosi, si arriva a un certo valore di regime del numero di Reynolds all'interno del quale il moto non è più laminare ma è turbolento (Figura 11) e la striscia di colore si frastaglia perché c'è una miscelazione più ampia e le particelle non scorrono più parallele a se stesse, ma si muovono con moto viscoso.

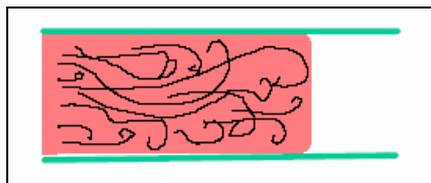


Figura 11: Linee di velocità in regime turbolento.

Il numero di Reynolds, per il flusso del sangue, è molto basso a causa dei bassi valori della velocità V , del diametro D e dei valori della viscosità η , che risulta essere 3-4 volte quella dell'acqua.

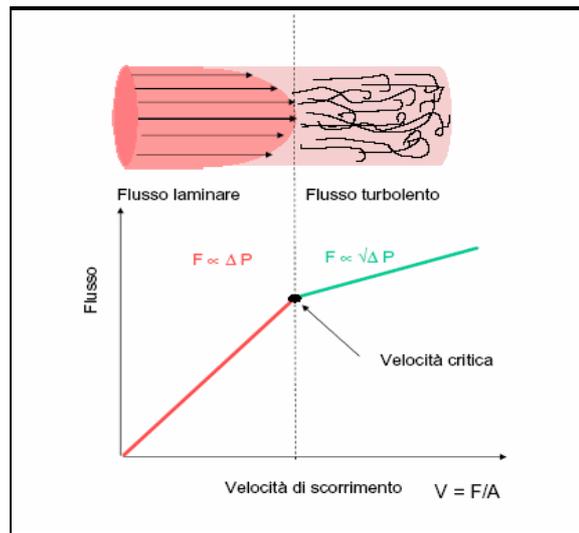


Figura 12: Passaggio da moto laminare a moto turbolento.

Per un liquido che scorre in un condotto cilindrico si ha moto laminare per $Re < 1000$ e moto turbolento per $Re > 2000$ (Figura 12).

Se il fluido scorre con velocità sufficientemente elevata, i globuli rossi, a causa delle forze propulsive e viscosive che provocano la rotazione in senso antiorario nella parte superiore del vaso e orario in quella inferiore vengono spinti verso l'asse centrale del vaso (Figura 13), dove la velocità di scorrimento è maggiore (accumulo assiale).

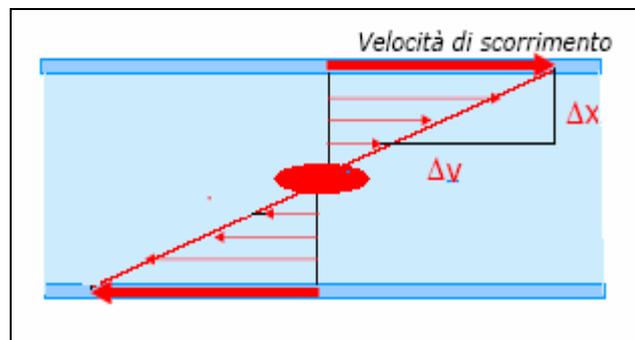


Figura 13: Profilo a farfalla del moto di un globulo soggetto a forze propulsive e viscosive.

La velocità di migrazione del globulo rosso è direttamente proporzionale al gradiente di velocità $\frac{\Delta V}{\Delta X}$. Poiché il gradiente di velocità è maggiore vicino alla parete del vaso, e si riduce dalla periferia verso il centro, i globuli rossi si accumulano al centro del vaso.

Il flusso sanguigno varia moltissimo nel sistema arterioso, soprattutto nelle condizioni in cui la presenza di placche arteriose e restringimenti endoluminali (interni al vaso) variano la caratteristica geometria del vaso producendo:

- una riduzione netta del diametro;
- lo sconvolgimento della struttura laminare del flusso e la comparsa di aree di ricircolo;
- separazione di flusso;
- flusso turbolento.

Questo provoca un cambiamento nella microstruttura la quale a sua volta agisce sul comportamento reologico del sangue.

Il profilo di velocità del sangue mostra un tratto appiattito rispetto ad una parabola; questo è dovuto al fatto che lo strato liquido in prossimità della parete è costituito essenzialmente da plasma ed agisce pertanto da lubrificante, provocando un abbassamento della viscosità apparente.

1.1.3 Deformabilità degli eritrociti

La deformabilità dei globuli rossi è necessaria per il trasporto dell'ossigeno ai tessuti. I fattori che determinano la deformabilità dei globuli rossi includono il rapporto tra volume e area superficiale della cellula, la viscosità del citoplasma ed il comportamento elastico della relativa membrana (Mohandas e Chasis 1993; Mohandas ed Evans 1994).

In sospensione in plasma o in altra soluzione isotonica, un globulo rosso consiste in una fine membrana flessibile che contiene un liquido costituito da una soluzione quasi satura di emoglobina (Tabella 2): l'interno della cellula è infatti costituito per il 32% di emoglobina (Pennell, 1964).

Sostanza	Percentuale in massa
Acqua	65
Componenti della membrana (proteine, fosfolipidi, colesterolo)	3
Emoglobina	32
Componenti inorganiche	
Potassio	0,42 g per 100 ml
Sodio	0,025 g per 100 ml
Magnesio	0,006 g per 100 ml
Calcio	Quantità piccole

Tabella 2: Composizione di un globulo rosso.

La membrana degli eritrociti consiste in un doppio strato fosfolipidico e nello scheletro sottostante che determinano insieme le relative proprietà elastiche. La cellula nel suo complesso si comporta come estremamente flessibile e tende a mantenere la sua forma di

disco biconcavo. Questa offre resistenza a flessione molto minore della resistenza a trazione. Il liquido newtoniano (con viscosità cinque volte maggiore di quella del plasma) contenuto all'interno del globulo, non offre resistenza elastica alla deformazione e concorre a rendere il globulo estremamente flessibile. Nel microcircolo il globulo modifica la forma biconcava assumendo la caratteristica configurazione a paracadute che gli consente di passare agevolmente in capillari di piccolissimo diametro, fino a 2-3 μm o attraverso il sistema di filtrazione della milza. Nel corso di tale processo il globulo rosso assume una forma tozza anteriormente ed affilata posteriormente, che suggerisce uno spostamento del suo contenuto liquido nella parte anteriore. Comportamento simile si osserva facendo aderire un globulo rosso ad un vetrino da microscopio ricoperto di albumina e assoggettandolo ad una tensione tangenziale: al crescere della tensione tangenziale il contenuto cellulare viene spostato dalla coda dilatata verso il corpo anteriore della cellula.

L'effetto di una velocità di deformazione applicata ad una sospensione di globuli rossi è quello di deformare le cellule e farle ruotare (Figura 14), ciò a causa del gradiente di velocità che sollecita ciascuna cellula.

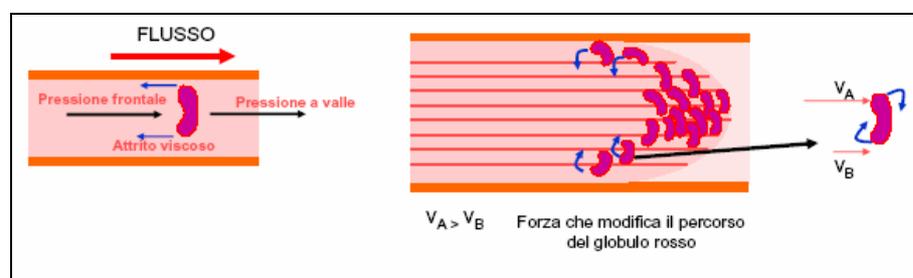
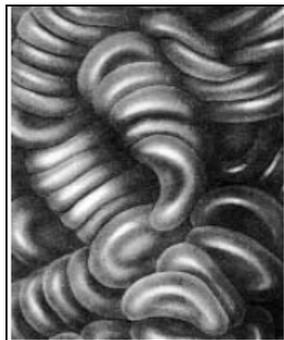


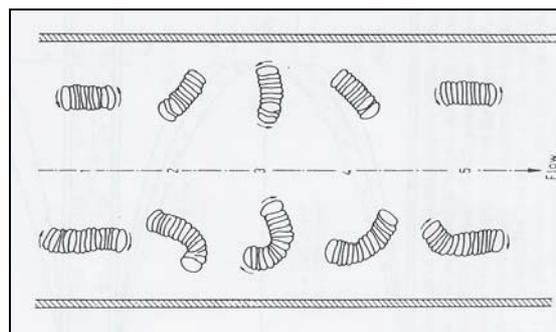
Figura 14: Globuli rossi dispersi in un fluido in moto laminare.

La rapidità con cui le particelle si deformano e ruotano dipende dalla velocità di deformazione del fluido: se questa assume valori intorno a 1 s^{-1} le cellule si flettono mentre ruotano, ma al crescere della velocità di deformazione le cellule cessano di ruotare e si limitano a traslare con il loro asse maggiore inclinato rispetto all'asse del condotto.

Ulteriore caratteristica dei globuli rossi è la loro tendenza ad aggregarsi. In particolare, si osserva che i globuli rossi danno luogo alla formazione dei cosiddetti *rouleaux* (Figura 15), sequenze di eritrociti che aderiscono l'uno all'altro.



(a)



(b)

Figura 15: (a) Aggregazione di globuli rossi ;

(b) Rotazione dei rouleaux in un vaso in flusso.

La presenza dei *rouleaux* si osserva a shear-rate molto bassi ed è a questo fenomeno che si può attribuire l'aumento della viscosità del

sangue η al decrescere di $\dot{\gamma}$ (velocità di deformazione o shear rate). Quando aumentiamo $\dot{\gamma}$ i *rouleaux* si disgregano e η diminuisce fino ad arrivare ad un plateau perché i globuli rossi (RBC), oltre a staccarsi dagli aggregati, si orientano sempre più nella direzione del flusso provocando una progressiva diminuzione della dissipazione viscosa fino ad un valore costante.

In Figura 16 possiamo notare la relazione (di tipo logaritmico) che intercorre tra la viscosità apparente e lo shear-rate in tre tipi di sospensioni, ciascuna contenente 45% in volume di RBC umani: NP rappresenta una sospensione di RBC normali in plasma; NA una sospensione di RBC normali in albumina ed HA una sospensione di RBC induriti in albumina.

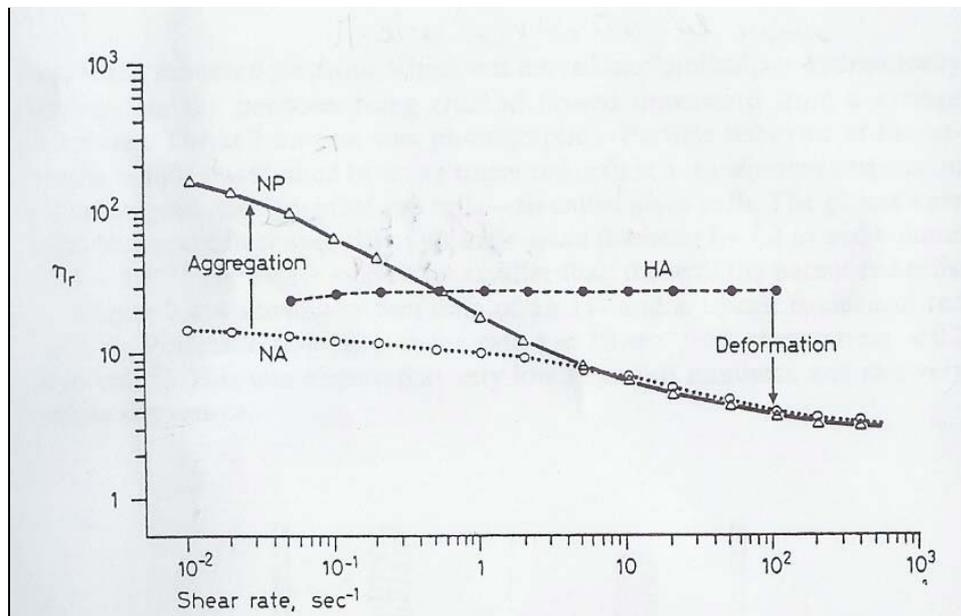


Figura 16: Relazione logaritmica tra la viscosità apparente e shear-rate in tre tipi di sospensioni di globuli rossi.

Presumibilmente l'attrazione fra le particelle è indotta da cariche superficiali presenti sulla membrana. Un ruolo importante è certamente anche svolto dalle macromolecole asimmetriche presenti nel plasma, in particolare fibrinogeno e globuline: l'aggregazione non avviene infatti in assenza di tale componente proteica (in particolare in sospensioni di globuli rossi in soluzioni saline o in siero di albumina, come NA in Figura 16), e si manifesta in misura crescente all'aumentare della concentrazione di fibrinogeno e globuline. La misura in cui *rouleaux* sono presenti nel flusso del sangue dipende quindi appunto dalla concentrazione di tali componenti. Si noti che, nei *rouleaux*, la dimensione massima degli eritrociti cresce mentre il loro spessore diminuisce, un'osservazione compatibile con la presenza di attrazioni reciproche. Inoltre, i *rouleaux* non si formano se la deformabilità dei globuli rossi viene ridotta irrigidendoli o rendendoli più sferici con l'utilizzo di glutaraldeide (curva HA in Figura 16). In conclusione, l'importanza dei *rouleaux* dal punto di vista meccanico è legato alla loro influenza sulla reologia del sangue alle basse velocità di deformazione e sulla velocità di sedimentazione.

1.2 Particolari patologie eritrocitarie

In questo lavoro di tesi si è iniziato a valutare il comportamento di globuli rossi affetti da alcune patologie; specificamente, sono stati analizzati macrociti, microciti e sferociti. Come già descritto in precedenza, la struttura della membrana eritrocitaria è tale da assicurare alla cellula la deformabilità necessaria per poter attraversare i vasi capillari. L'eritrocita maturo, come si è detto, ha la forma di un disco biconcavo e ciò gli conferisce la caratteristica di un elevato rapporto superficie/volume, vantaggioso in quanto gli permette di deformarsi, aumentando anche del 230% la sua lunghezza. La base strutturale di questa caratteristica è costituita dall'elasticità delle molecole di spectrina (una delle proteine del citoscheletro), le quali possono allungarsi o accorciarsi a seconda della necessità. Vi sono però condizioni patologiche (alcune anemie emolitiche, congenite o acquisite) in cui, o per un'anomalia delle proteine del citoscheletro, o per una parziale fagocitosi macrofagica, si verifica una riduzione dell'area di superficie della membrana eritrocitaria, con conseguente riduzione della capacità del globulo rosso di deformarsi e quindi di sopravvivere.

Per anemia s'intende una riduzione della quantità totale di emoglobina circolante nel sangue periferico e all'interno degli eritrociti. Le anemie si distinguono in quattro gruppi, secondo i meccanismi patogenetici responsabili:

- **I gruppo:** ridotta formazione di eritoblasti (precursori degli eritrociti, si trovano normalmente nel midollo osseo, mentre compaiono nel sangue periferico in epoca neonatale oppure in corso di gravi processi patologici)
- **II gruppo:** ridotta formazione di eritrociti (eritropoiesi inefficace)
- **III gruppo:** ridotta sintesi di emoglobina
- **IV gruppo:** ridotta sopravvivenza degli eritrociti (emolisi).

Le anemie del II gruppo sono caratterizzate prevalentemente da una ridotta formazione di eritrociti, spesso più grandi del normale (**macroцитi** o megalociti). Le anemie del III gruppo sono dovute ad un difetto della sintesi emoglobinica; perciò, al basso livello di emoglobina corrisponderà un numero quasi normale, o relativamente alto, di eritrociti. Inoltre questi eritrociti sono piccoli (**anemia microcitica**).

La **microcitemia** è un particolare tipo di anemia congenita (ossia l'individuo nasce già con questa malattia), dovuta ad una alterazione genetica per cui l'emoglobina è alterata. Vi sono vari tipi di microcitemia, ma quella più frequente in Italia è la β -talassemia detta anche anemia mediterranea. La lettera greca β sta ad indicare che l'errore genetico causa una alterazione nella produzione delle catene β dell'emoglobina. I globuli rossi che così si formano sono più *fragili* ed

hanno una vita media più breve dei 120 giorni del globulo rosso normale. Pertanto, in seguito a ciò, i globuli rossi vengono continuamente distrutti e rimpiazzati. Questa distruzione causa, nei soggetti con la malattia in forma grave, un accumulo di ferro in vari organi, ma principalmente nel fegato. Inoltre in questi pazienti il midollo osseo, produttore di tutte le cellule del sangue, non riesce a star dietro alla distruzione dei globuli rossi alterati; tale fenomeno è detto *eritropoiesi inefficace* con conseguente anemia marcata.

Uno dei parametri utili a diagnosticare un certo tipo di anemia è il volume corpuscolare medio o MCV (mean corpuscular volume) :

$$\text{MCV in fl}^3 = \frac{\text{ematocrito} \cdot 10}{\text{num. eritrociti per mm}^3}, \text{ in milioni}$$

I valori normali di MCV sono compresi fra 80 e 100 fl³. Un'anemia con MCV superiore a 100 fl³ sarà un'anemia macrocitica, un'anemia con MCV inferiore a 80 fl³ sarà un'anemia microcitica. La natura microcitica o macrocitica è confermata dall'osservazione al microscopio del sangue periferico. Rispetto alle emazie normali, i microciti e i macrociti presenteranno un diametro rispettivamente minore o maggiore della norma.

1.3 Stato dell'arte clinico

Molteplici sono le patologie correlabili con alterazioni delle proprietà del sangue, microscopicamente viste come un'alterazione del comportamento reologico. L'aumento di viscosità (per esempio nella policitemia) determina un aumento della resistenza al flusso, con

conseguente aumento del lavoro cardiaco. Viceversa nelle anemie la viscosità tende a ridursi.

Una netta modifica della viscosità può inoltre essere causata da alcune malattie e da alterazioni del sangue periferico. Ci si riferisce alla Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essenziale (TE), Mielofibrosi Idiopatica (MF) ed eritrocitosi da cause diverse (emoglobinopatia, iperincrizione di Epo, alterazioni del recettore dell'eritropoietina). Denominatore comune di questi stati patologici è l'aumento nel numero di cellule circolanti, in diversa possibile e variabile combinazione. L'iperviscosità è alla base di gravi complicanze vascolari, con sistematico coinvolgimento soprattutto del microcircolo. A sua volta l'iperviscosità può essere causata o da un aumento della concentrazione dei corpuscoli circolanti o da una loro ridotta deformabilità.

Da un punto di vista terapeutico, allo stato delle conoscenze, le cure delle patologie su indicate mirano a ridurre l'iper cellularità, così da ottenere anche un miglioramento della viscosità. Nelle condizioni di eritrocitosi il principale presidio terapeutico è la salasso terapia per indurre iposiderosi (carenza di depositi di ferro). Il principale effetto collaterale è la comparsa di una patologia dei globuli rossi, i quali, proprio per la mancanza di ferro, diventano più piccoli, con minore contenuto di emoglobina e meno deformabili (microciti ed ipocromici). In queste condizioni la viscosità migliora nei grossi vasi, ma sostanzialmente peggiora nel microcircolo proprio per la presenza di globuli rossi che per la ridotta deformabilità circolano male nei capillari.

Un altro tipo di alterazione degli eritrociti è la **sferocitosi**, che può essere comunque evidenziata dall'osservazione al microscopio: nella sferocitosi si ha la presenza di eritrociti che invece della normale forma biconcava hanno una forma tendenzialmente sferica con perdita della zona chiara centrale. La sferocitosi è caratteristica della malattia di Minkowsky-Chauffard (o sferocitosi ereditaria) e si riscontra spesso nelle anemie emolitiche autoimmuni (nelle anemie emolitiche autoimmuni avviene un'emolisi in seguito alla produzione da parte di un individuo di anticorpi diretti verso uno o più antigeni della membrana eritrocitaria. Questo processo porta alla distruzione, da parte dei macrofagi tessutali, degli eritrociti rivestiti dagli anticorpi).

Gli sferociti hanno un MCV normale o lievemente ridotto, ma a causa del ridotto rapporto superficie di membrana/volume vanno incontro a lisi più velocemente delle cellule normali. La forma sferica e la struttura rigida impediscono il passaggio delle emazie attraverso i capillari della milza. L'asportazione della milza (splenectomia) corregge pertanto questo tipo di anemia, sebbene il difetto eritrocitario rimanga immutato.

1.4 Stato dell'arte scientifico

Il passaggio dei globuli rossi attraverso i microcapillari è stato da tempo riconosciuto come problema fondamentale in fisiologia e biomeccanica, non soltanto relativamente alle proprietà di trasporto e reologiche dei globuli nella microcircolazione, ma anche all'idrodinamica del flusso di sangue su larga scala. Le osservazioni *in*

vivo ed *in vitro* hanno indicato che quando viaggiano lungo capillari il cui diametro è paragonabile, o più piccolo, del diametro massimo delle cellule, i globuli rossi si organizzano in singola fila. Man mano che il diametro del tubo diventa più grande, si sviluppano file doppie e multiple di globuli.

Una caratteristica importante del flusso di una sospensione di globuli rossi è una particolare distribuzione radiale degli stessi: i globuli rossi tendono a migrare lontano dalla parete del canale e, di conseguenza, si ha la formazione di uno strato povero di globuli vicino alla parete dovuto all'allontanamento spontaneo delle cellule dalle pareti verso le regioni di basso shear-rate, vicino alla mezzera. Poiché le cellule tendono a concentrarsi in questa regione di alta velocità, la loro portata volumetrica eccede quella del liquido complessivo: facendo un semplice bilancio di massa si può osservare che l'*effetto Fåhræus* è una conseguenza di questo fenomeno.

Fåhræus, infatti, ha osservato che la portata volumetrica della fase sospesa, consistente nelle cellule, è superiore alla portata volumetrica della sospensione e la differenza è più notevole nei vasi in cui il diametro è inferiore a 300 μm . Quindi, se la sospensione è raccolta all'estremità di un tubo, la frazione del volume delle cellule trasportate, chiamato ematocrito di scarico, sarà superiore alla frazione del volume all'interno del tubo, denominato ematocrito del tubo. Un'implicazione importante dell'effetto Fåhræus è che l'ematocrito nominale, identificato con l'ematocrito del tubo nella microcircolazione, è distribuito irregolarmente nel sistema cardiovascolare. La migrazione dei globuli rossi verso la zona centrale

del canale determina zone a diversa viscosità: la viscosità del fluido è maggiore in prossimità dell'asse del condotto e minore verso la parete. Tale circostanza comporta un leggero appiattimento del profilo di velocità, rispetto al profilo parabolico che avrebbe un fluido newtoniano in flusso nello stesso tipo di condotto.

Il gradiente di pressione necessario per guidare il globulo attraverso i vasi capillari può essere espresso in termini di *viscosità effettiva* o *apparente*. Riducendo il diametro del vaso, la viscosità apparente diminuisce, a causa del sopraccennato sviluppo dello strato più vicino alla parete privo di cellule, secondo l'*effetto Fåhræus-Lindqvist* (Figura 17).

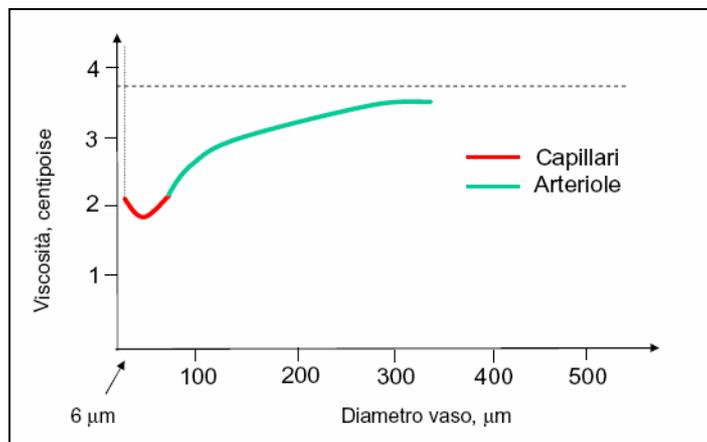


Figura 17: Effetto Fåhræus-Lindqvist.

Quando il raggio del capillare diventa paragonabile al diametro massimo delle cellule non deformate, la viscosità apparente raggiunge un minimo e poi inizia ad aumentare, a causa di occlusioni meccaniche. Fisicamente, la cellula deve “strizzarsi” attraverso i microcapillari. Quando, invece, raggiunge una soglia che è approssimativamente uguale a 1,42 µm, le cellule non possono più

muoversi attraverso i vasi capillari e la viscosità apparente della sospensione diventa infinita.

Un gran numero di studi teorici hanno posto l'attenzione sul movimento dei globuli rossi attraverso vasi capillari cilindrici con due obiettivi principali: predire il rapporto tra la particella e la portata totale e valutare la viscosità apparente della sospensione. Studi illuminanti dal punto di vista della dinamica dei globuli rossi sono stati portati avanti da Secomb (1992, 1995, 2003). Inizialmente, le cellule sono state modellate come palline di solido elastico. Modelli più realistici hanno usato la teoria dei gusci sottili per rappresentare la virtuale incompressibilità e le proprietà elastiche della membrana delle cellule. Una formulazione diversa è stata sviluppata da Zarda et al (1997), Skalak e Tözeren (1980) e Özkaya (1986), che hanno usato il metodo degli elementi finiti per risolvere le equazioni del moto a basso numero di Reynolds. Barthès-Biesel et al (1994, 2002), hanno studiato il passaggio simmetrico all'asse di capsule sferiche e sferoidali attraverso pori, tubi e costrizioni.

Secomb et al (1987) hanno sviluppato un modello più maneggevole basato sull'approssimazione della teoria della lubrificazione ed hanno formulato un problema di valore limite che coinvolge equazioni differenziali ordinarie. Più recentemente, Secomb ha generalizzato il modello basato sulla teoria della lubrificazione per rappresentare lo strato superficiale endoteliale. Hsu e Secomb (1989) hanno esteso il modello basato sulla teoria della lubrificazione alle tre dimensioni ed hanno studiato il movimento delle cellule fuori dell'asse di un capillare cilindrico, in accordo con il movimento di *tank-*

treading della membrana. I loro risultati hanno indicato che la velocità di *tank-treading* della membrana è molto più piccola della velocità delle cellule ed il movimento di *tank-treading* riduce la resistenza al flusso.

La formulazione dell'elemento finito di Zarda e degli autori successivi trascura le interazioni delle cellule e descrive il movimento di più cellule come se ce ne fosse una sola. D'altra parte, il modello basato sulla teoria della lubrificazione si concentra sul flusso all'interno dell'intercapedine fra le cellule e la parete del capillare e ipotizza che il movimento fra le cellule adiacenti si approssimi bene al flusso parabolico di Poiseuille. Inoltre, nella maggior parte degli studi, il modello basato sulla teoria della lubrificazione è indifferente alla forma delle cellule in condizioni statiche; cioè, se il flusso viene interrotto, le cellule ritorneranno allo stato indeformato di sfere. Nelle simulazioni di Secomb ed altri, l'area di questa sfera equivalente è uguale all'area reale del globulo rosso. Questa limitazione è stata rimossa recentemente da Secomb stesso.

In un recente lavoro di C. Pozrikidis (2005) queste ipotesi semplificative sono state rimosse, considerando il movimento assial-simmetrico di una fila di cellule al variare della distanza tra le cellule ed al diametro del tubo, nel contesto di flusso di Stokes. Il comportamento quasi incompressibile ed elastico della membrana delle cellule è modellato da un'apposita equazione costitutiva. Le simulazioni numeriche sono presentate per una varietà di stati di flusso. I risultati illustrano la dipendenza dell'ematocrito e della

viscosità apparente dalla spaziatura tra le cellule, dal diametro del tubo e dalla velocità media del flusso.

Diversi studi, poi, sono stati condotti utilizzando microcanali che potessero in qualche modo riprodurre i capillari umani. Tsukada, Sekizuka, Oshio e Minamitani (2000) hanno usato microcanali trasparenti su un substrato di vetro come modello di capillare per misurare la deformabilità dei globuli rossi *in vitro* (Figura 18).

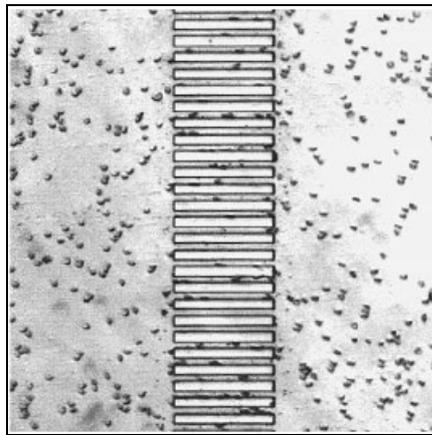


Figura 18: Microcanali su un substrato di vetro.

Gli autori hanno osservato la deformazione degli eritrociti, simmetrica rispetto all'asse del canale, ed hanno definito un indice di deformazione (Figura 19) ricavabile direttamente dall'osservazione degli eritrociti in flusso.

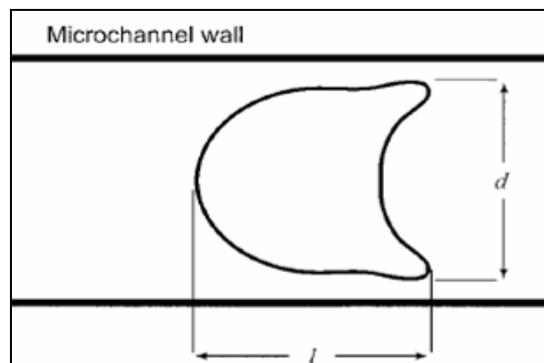


Figura 19: Schema di globulo rosso deformato simmetricamente rispetto all'asse. **Indice di deformazione (DI) = l/d**

Utilizzando una telecamera ad alta velocità (1000 frame /sec), è stato possibile riprendere gli eritrociti che si deformavano nella tipica forma a paracadute, proprio come accade *in vivo*. Usando questo metodo, la deformabilità di globuli sani è stata confrontata con quella di eritrociti affetti da microangiopatia, una complicanza caratteristica del diabete mellito; la causa di questa complicanza potrebbe proprio essere la diminuzione nella deformabilità dell'eritrocita. La deformabilità degli eritrociti diabetici misurata era effettivamente più bassa di quella degli eritrociti nei globuli sani. Questo risultato indica che la deformabilità alterata in eritrociti diabetici può causare alterazioni della viscosità ed aumentare la sollecitazione di shear sulle pareti dei microcapillari. Il limite di tale studio è che vengono utilizzati canali rigidi: ci si allontana cioè dal caso reale in cui i globuli rossi scorrono in capillari flessibili.

Chiu e Shelby nel 2003 hanno analizzato la capacità di eritrociti infetti da malaria di fluire all'interno di microcanali in PDMS (polidimetilsilossano, elastomero a base di silicone). Il modulo elastico del PDMS fornisce una buona approssimazione delle proprietà geometriche e strutturali dei capillari umani. Questi microcanali dovrebbero simulare i capillari di diametro da 8 a 2 μm . La velocità media del flusso nella parte centrale della scanalatura ripropone la naturale velocità nei capillari (100-500 $\mu\text{m/s}$ ca). Uno schema del microcanale è riportato in Figura 20.

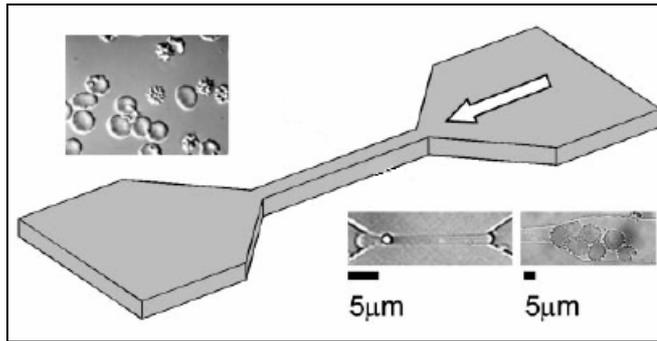


Figura 20: Geometria del microcanale

Il *Plasmodium falciparum* è un parassita, causa della malaria maligna, che, infettando gli eritrociti del soggetto contante, ne determina l'irrigidimento e, quindi, l'ostruzione dei capillari. In tutte le prove con gli eritrociti sani, è stata osservata poca o nessuna aderenza alle pareti del canale; inoltre queste cellule altamente flessibili sono passate facilmente attraverso tutti i tratti della scanalatura, compresa la riduzione di 2 µm. Gli eritrociti infettati, nella prima fase dell'infezione, come gli eritrociti normali, hanno attraversato la zona di dimensione minore senza difficoltà.

Nella seconda fase dell'infezione, invece, i globuli infettati hanno avuto difficoltà nel passare attraverso i canali di 2 µm e di 4, ma sono riusciti ad attraversare quelli di 6 e di 8 µm. In questi globuli sono stati osservati i primi segni che indicano una mancanza di deformabilità. I pochi eritrociti con i parassiti della terza fase che si sono compressi nel passare attraverso il canale di 4 µm non hanno recuperato rapidamente la loro forma all'uscita dal canale. Questi globuli hanno ostruito i tratti più stretti del canale ma hanno attraversato i tratti più larghi con relativa facilità.

Gli eritrociti nella quarta fase dell'infezione hanno esibito una rigidità marcatamente più elevata. Queste cellule hanno avuto difficoltà a passare anche nei canali di 6 e 4 μm . I risultati ottenuti in queste strutture di PDMS convalidano l'uso dei microcanali come sistema per simulare i capillari *in vivo*.

Sempre in questo lavoro è mostrato un esempio *in vitro* di *pitting* (lett. “puntinatura”), ispirato ai risultati in microscopia elettronica per il *pitting* dei parassiti dagli eritrociti in alcune zone della milza, presentati da Schnitzer ed altri. Il fatto che i globuli più infetti riescano ad evitare i capillari è un meccanismo importante grazie al quale il parassita evita la milza, in cui esistono efficienti meccanismi per distruggerlo. Durante il *pitting*, il parassita intracellulare è respinto fisicamente e alla fine è staccato dall'eritrocita, che può essere restituito alla circolazione. Nella prova *in vitro*, portata avanti usando un canale di 2 μm , la parte sana della cellula passa attraverso la restrizione mentre la parte infettata dal parassita rimane nel tratto più largo della scanalatura. La membrana delle cellule continua ad allungarsi fino ad arrivare alla rottura della membrana, rimuovendo il parassita dalla cellula. In questo lavoro viene inoltre mostrato come un globulo sano riesca a deformarsi ed a passare attraverso un cumulo di globuli infettati che ostruiscono il canale. Questo spiega perché trasfusioni di sangue riescono temporaneamente ad alleviare alcuni effetti della malaria (Drondorp et al., 2000).

Tale lavoro, in definitiva, rappresenta un passo in avanti verso una riproduzione più fedele del comportamento *in vivo*, rispetto all'utilizzo di capillari in vetro. Il metodo di creazione dei canali, di

sezione rettangolare, non è comunque dei più semplici ed economici, ed ulteriori passi in avanti possono essere realizzati.

1.5 Sistemi Modello

Le dimensioni micrometriche degli eritrociti, al limite della risoluzione strumentale, rendono di difficile analisi alcuni aspetti di carattere fluidodinamico, quali ad esempio lo studio del campo di moto in prossimità delle pareti del canale ed in corrispondenza delle zone anteriori e posteriori, in prossimità del globulo stesso. Da qui l'esigenza di ricorrere ad un sistema modello per lo studio di tali fenomeni. Di notevole interesse in questo senso, risulta essere il sistema costituito da una goccia di fluido dispersa in matrice entro un capillare di dimensioni paragonabili a quelle della goccia stessa. Il sistema più semplice da analizzare è quello di goccia sottoposta a flusso di shear semplice.

Consideriamo la situazione idealizzata, ma basilare, di una singola goccia in condizioni di flusso ben controllato e non confinato, cioè dimensioni del capillare molto maggiori rispetto alle dimensioni della goccia stessa. Tale argomento ha ricevuto molte attenzioni nella letteratura scientifica, sia dal punto di vista teorico che sperimentale, fin dal lavoro di G. Taylor e dai successivi lavori di Rallison e di Stone.

La maggior parte della letteratura, riguardo alla deformazione e alla rottura delle gocce, focalizza l'attenzione principalmente su

sistemi puramente Newtoniani, cioè in cui sia la fase dispersa che quella continua sono Newtoniane e presentano comportamento puramente viscoso.

Una singola goccia Newtoniana, immersa in una matrice anch'essa Newtoniana soggetta ad un flusso di scorrimento, è interessata da:

- ✓ Una deformazione dall'originaria forma sferica.
- ✓ Un'orientazione nella direzione del flusso.
- ✓ Una circolazione interna.

Chiaramente, la deformazione aumenta al crescere del gradiente di velocità e, per valori sufficientemente elevati di tale gradiente, si ha la rottura della goccia.

Recentemente sono stati sviluppati dei modelli fenomenologici che, pur tralasciando la possibilità di ottenere una soluzione esatta, hanno il merito di fornire una stima del comportamento fluidodinamico con buona approssimazione. Tali modelli partono dall'assunzione che la forma della goccia sia sempre ellissoidale ("ellipsoidal model"). Di norma, in prima approssimazione, si considerano la goccia abbastanza piccola rispetto a qualsiasi altra grandezza caratteristica del sistema, il fluido, che costituisce la matrice, non confinato e il campo di velocità indisturbato "all'infinito", lineare. Inoltre il numero di Reynolds:

$$Re = \frac{\rho \cdot L \cdot v}{\eta} \ll 1 \quad Eq. 1$$

dove:

- ✓ Viscosità (η).

- ✓ Densità (ρ)
- ✓ Velocità caratteristica (v)
- ✓ Dimensione caratteristica (L)

Infine, le forze esterne e la spinta idrostatica si assumono trascurabili, i due fluidi sono considerati mutualmente immiscibili ed incompressibili e si suppone la temperatura costante. Dall'analisi dimensionale si evince che, per fluidi Newtoniani, i fenomeni descritti possono essere studiati servendosi di due parametri adimensionali:

$$Ca = \frac{\eta_c \cdot R_0 \cdot \dot{\gamma}}{\sigma} \quad Eq. 2$$

$$\lambda = \frac{\eta_d}{\eta_c} \quad Eq. 3$$

Dove:

- ✓ Velocità di Scorrimento ($\dot{\gamma}$)
- ✓ Raggio delle gocce (R_0).
- ✓ Viscosità della fase dispersa (η_d) e continua (η_c).
- ✓ Tensione interfacciale tra le fasi (σ).

Ca è il numero di Capillare, definito come il rapporto tra gli sforzi idrodinamici $\eta_c \cdot \dot{\gamma}$, che tendono a deformare e rompere la goccia, e gli sforzi interfacciali σ/R_0 , che si oppongono a tale deformazione. Con λ si indica il rapporto di viscosità tra fase dispersa e fase continua. La deformazione di una goccia in flusso di scorrimento è strettamente legata al valore assunto da questi parametri, come sarà spiegato in seguito.

Imponendo un flusso di scorrimento semplice, tale da avere piccole deformazioni, si osserva un iniziale transitorio di deformazione seguito da una condizione stazionaria in cui la goccia assume una forma prossima ad un ellissoide (*Figura*). E' importante, come già rilevato, definire la dipendenza dal numero di Capillare dei parametri che descrivono la deformazione e l'orientazione della goccia. Tali parametri sono:

$$D = \frac{R_{\max} - R_{\min}}{R_{\max} + R_{\min}} \quad \text{Eq. 4}$$

Dove:

- ✓ Parametro di deformazione (D)
- ✓ Semiasse maggiore (R_{\max}) della sezione della goccia con il piano di scorrimento.
- ✓ Semiasse minore (R_{\min}) della sezione della goccia con il piano di scorrimento.

$$\theta = \frac{\pi}{2} - \phi_{\max} \quad \text{Eq. 5}$$

dove:

- ✓ Angolo di orientazione (θ).

Tale angolo è individuato dall'asse maggiore della goccia e dalla direzione del gradiente di velocità del flusso di scorrimento (*Figura*)

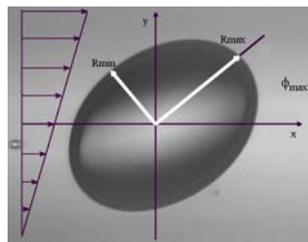


Figura 21: Parametri geometrici, vista vorticità.

I parametri sopra menzionati si riferiscono alla geometria del sistema osservato lungo l'asse della vorticità del flusso di scorrimento.

Si individuano ora i parametri descrittivi della vista lungo l'asse del gradiente di velocità (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**), in cui

- ✓ Asse della goccia (R_p) proiettato sul piano di scorrimento.
- ✓ Asse della goccia (R_z) nella direzione di vorticità del flusso.

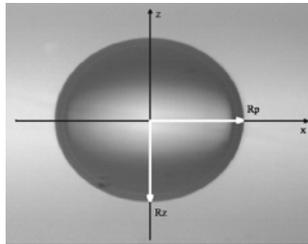


Figura 22: *Parametri geometrici, vista gradiente.*

In entrambe le viste, vorticità e gradiente, il contorno della goccia è ben approssimato da un'ellisse.

Studi effettuati su singole gocce in flusso di scorrimento hanno portato a comprendere che la rottura avviene quando il numero di Capillare raggiunge un valore critico Ca_{cr} di ordine 1. Questo valore critico è funzione del rapporto di viscosità λ ed, in maniera più ridotta, dalla frazione volumetrica della fase dispersa ϕ . Taylor (1934), come già detto, ha sviluppato una teoria per gocce poco deformate (*small deformation theory*) in flusso di scorrimento con λ dell'ordine dell'unità. Questa teoria gli ha consentito di ricavare un'espressione teorica per le condizioni di rottura:

$$Ca_{cr} \cong 0.5 \quad Eq. 6$$

Quando le gocce sono molto deformate è più appropriato usare una teoria per corpi allungati (*slender body theory*), come può accadere in sistemi in cui $\lambda \ll 1$, [Hinch e Acrivos, 1980]. Il capillare critico ricavato da questa teoria dipende dal rapporto di viscosità secondo la relazione:

$$Ca_{cr} = 0.054 \cdot \lambda^{-2/3} \quad Eq. 7$$

Grace (1982) riscontrò sperimentalmente quanto predetto dalla teoria di Taylor: infatti, per valori del rapporto di viscosità compresi tra 0.1 e 1, $Ca_{cr}=0.5$. Per valori di λ superiori a 4, invece, Grace trovò che le gocce non riescono più a rompersi, mentre per valori di λ inferiori a 0.1, $\log(Ca_{cr})$ varia linearmente con $\log(\lambda)$. E' stato anche osservato che esiste un valore limite di λ al disotto del quale la rottura non avviene. Nel caso di flusso di scorrimento tale valore è approssimativamente pari a 0.005.

Molto meno studiato è il caso di flusso semplice microconfinato, con dimensioni del capillare cioè, paragonabili a quelle della goccia. Si possono individuare tre regimi in funzione di $d/2R_0$, dove d è appunto la dimensione del capillare, ed R_0 , come sopra definito, il raggio della goccia: per $d/2R_0 \geq 3$, la goccia si rompe in satelliti ad un certo numero di capillare. Per $1.3 \leq d/2R_0 < 3$, gli effetti del confinamento si avvertono, la forma della goccia diventa asimmetrica, la velocità iniziale di allungamento della goccia diminuisce. Per valori sufficientemente bassi di $d/2R_0$ la goccia diventa stabile per numeri di capillare maggiori del Ca_{cr} in assenza di confinamento.

Nel loro articolo riguardo al moto laminare di una goccia sottoposta ad un flusso di scorrimento con effetto parete, Shapira e Haber hanno studiato le interazioni idrodinamiche tra una goccia immersa in un flusso alla Couette e le pareti che la confinano. La loro analisi si basa sulle ipotesi di inerzia trascurabile e che la goccia mantenga una forma pressoché sferica. Con l'ausilio del metodo di riflessione di Lorentz, hanno ricavato in primo luogo una soluzione analitica al primo ordine per il caso di goccia vicina ad una sola parete, poi una soluzione integrale per la configurazione di una goccia, che interagisce con entrambe le pareti. Inoltre, hanno ottenuto una correzione al primo ordine sia per gli effetti di parete, sia per la forza di trascinamento, sia per la deviazione dalla forma sferica della goccia, sempre trascurando le interazioni idrodinamiche tra gocce adiacenti.

Il metodo della riflessione di Lorentz, che è stato descritto da Happel e Brenner, è stato modificato dagli autori affinché convergesse più rapidamente. Secondo il metodo di riflessione tradizionale, le condizioni al contorno alla parete e all'interfaccia della goccia sono soddisfatte in modo alternato. Essenzialmente, risultano sufficienti tre riflessioni per descrivere le principali caratteristiche del campo di flusso. Gli autori hanno utilizzato coordinate sferiche r , θ e φ , per individuare il centro della goccia e la sua forma deformata: dove r è la distanza dall'origine del sistema di riferimento, θ è l'angolo di latitudine misurato dall'asse z e φ è l'angolo di azimut misurato dall'asse x . Sovrapponendo la deformazione della goccia dovuta al semplice flusso D_T , che è uguale al parametro di deformazione di

Taylor, con la deformazione dovuta all'effetto parete D_w , hanno ottenuto la deformazione totale D :

$$D = D_T + D_w$$

Eq. 8

$$D = D_T \left[1 + \left(\frac{R_0}{h} \right)^3 \frac{1 + 2.5\lambda}{1 + \lambda} \right] \cdot C_S \cdot \sin \theta \cdot \cos \theta \cdot \cos \varphi$$

Eq. 9

Che in coordinate cartesiane diventa:

$$D = D_T \left[1 + \left(\frac{R_0}{h} \right)^3 \frac{1 + 2.5\lambda}{1 + \lambda} \right] \cdot C_S \quad \text{Eq. 10}$$

Dove:

- ✓ Distanza della parete dal centro della goccia (h).
- ✓ Fattore di forma (C_S).

Secondo tale equazione l'effetto parete non altera la forma della goccia deformata ma incrementa semplicemente la deformazione. Il coefficiente di forma C_S cresce considerevolmente quando la goccia è fortemente confinata dalle pareti. L'analisi a tre riflessioni non è sufficiente per descrivere gli effetti idrodinamici totali nel caso in cui la goccia sia schiacciata.

In vicinanza della parete abbiamo per il fattore di forma C_S :

$$\lim_{h \rightarrow 0} C_S \cdot \left(\frac{h}{H} \right)^3 = \frac{3}{8} \quad \text{Eq. 11}$$

Dove:

- ✓ Distanza fra le pareti (H).

Si riporta in Figura l'andamento del fattore di forma della goccia rispetto alla sua posizione tra le due pareti.

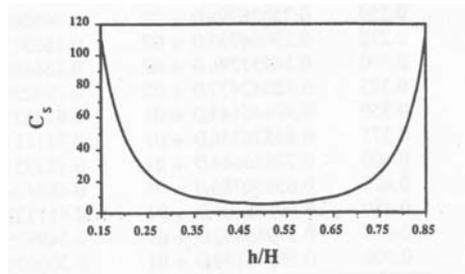


Figura 23: Fattore di forma vs posizione della goccia.

Ancor meno esplorato è il caso di flusso microconfinato in capillari. In questo caso, tra i parametri che governano il fenomeno, troviamo, oltre al numero di capillare, definito diversamente rispetto al caso di shear semplice, ed al rapporto di viscosità λ , un terzo parametro k , rapporto fra la dimensione della goccia dispersa e quella del capillare stesso:

$$Ca = \frac{\eta_c \cdot V}{\sigma}$$

$$\lambda = \frac{\eta_d}{\eta_c}$$

$$K = \frac{a}{R}$$

Dove:

- ✓ Velocità media del flusso (V)
- ✓ Viscosità della fase dispersa (η_d) e continua (η_c).
- ✓ Tensione interfacciale tra le fasi (σ).
- ✓ Raggio della goccia indeformata (a).
- ✓ Raggio del capillare (R).

Anche se il problema non è stato fin qui estesamente investigato, in letteratura sono presenti dati sia sperimentali che simulativi, che però si concentrano soprattutto sulla morfologia del fenomeno, ed in particolare a valori di $\lambda \leq 1$, distanti dal caso di interesse del sangue umano, in cui $\lambda \sim 5$.

Simulazioni numeriche, condotte da Skalak *et al.* (1972), Chi *et al.* (1982), ed Udell *et al.* (1990) mostrano come la goccia si allunga sempre di più nella direzione assiale al crescere del numero di capillare, assumendo per bassi valori di questo la caratteristica forma a proiettile. La curvatura della coda posteriore diminuisce al crescere di Ca e cambia di segno per valori di Ca prossimi ad 1, conducendo poi a una rientranza della stessa molto simile a quella che si vede per gli eritrociti. Dal punto di vista teorico, un lavoro di riferimento può considerarsi quello di Hetsroni (1970), che ha usato il metodo della riflessione per risolvere i campi di flusso dentro ed intorno una goccia indeformata sottoposta a flusso alla Poiseulle. Detta U la velocità della goccia, per bassi valori di K, Hetsroni propone la seguente equazione :

$$U/V = 2 - \frac{4\lambda}{3\lambda + 2} \cdot K^2 + O(\lambda^3)$$

Dal momento che la goccia è assunta sferica, le condizioni al contorno sulla componente normale dello stress non sono soddisfatte. Comunque, sostituendo i campi di velocità per una goccia indeformata, questa condizione al contorno fornisce una prima approssimazione alla forma deformata della goccia.

$$r = r_0 \left[1 + \frac{1}{2} L_3^0 (5 \cos^3 \vartheta - 3 \cos \vartheta) \right] + O(\lambda^3)$$

dove

- $L_3^0 = \frac{10 + 11\lambda}{10(1 + \lambda)} \cdot Ca \cdot K^2$
- r_0 = raggio della goccia indeformata
- r = raggi variabile misurato relativo al centro della goccia
- θ = angolo polare misurato in senso antiorario dall'asse del vettore velocità.

Si noti come, la deviazione dalla forma sferica è predetta crescere linearmente con Ca e di aumentare lentamente al crescere di λ .

Un lavoro sperimentale di notevole rilievo, e che ha dato supporto alla teoria di Hetsroni, è quello di Ho & Leal (1975), che ha fornito diversi risultati sia qualitativi che quantitativi, ma solo per rapporto di viscosità λ prossimo o inferiore ad 1. In particolare, tale lavoro afferma che la larghezza della goccia aumenta all'aumentare di K , ma diviene costante per K prossimi o maggiori di 1. In altri termini, lo spessore dello strato di fluido tra la goccia e la parete è indipendente dalle dimensioni della goccia per $K \geq 1$.

Le gocce diventano più allungate al crescere di Ca ed al crescere di λ . I cambiamenti morfologici sono funzione forte della velocità del fluido e funzione debole di λ (una variazione di un ordine di grandezza di λ equivale ad una variazione del 30% della velocità del fluido), in accordo con la formula di Hetsroni. In questo lavoro sono anche studiati i campi di flusso intorno ed all'interno della goccia. Il fluido

all'interno della goccia ricircola, senza un movimento netto. Il movimento della fase dispersa può essere diviso in due zone, una zona centrale in cui il fluido ricircola tra due gocce successive adiacenti, che si muove con la stessa velocità della goccia, ed una zona tra la goccia e la parete, che si muove più lentamente della goccia. Un risultato importante di questo lavoro consiste nell'aver trovato che la velocità della goccia è maggiore della velocità media del fluido, ma minore della velocità massima della stessa. La velocità della goccia diminuisce all'aumentare di K , fino a $K \sim 0.9$, dopodiché diviene indipendente da K . U/V aumenta all'aumentare di V ed al diminuire di λ . A differenza della morfologia della goccia, V e λ hanno qui lo stesso tipo di influenza sul parametro U/V .

Un altro studio sperimentale molto interessante è stato condotto da King ed Olbricht nel 1992, per valori di λ sia molto minori che prossimi ad uno, e per un largo range di numeri di capillare. Per numeri di Ca dell'ordine 10^{-2} - 10^{-1} i risultati morfologici confermano quelli delle simulazioni numeriche su esposte. Si è visto inoltre come il gap tra il contorno della goccia in flusso e la parete (strato di fluido libero) adimensionalizzato sulla dimensione del capillare diminuisce al crescere di λ , e cresce all'aumentare di Ca , ma solo quando λ è prossimo a uno. Per valori molto bassi di λ , infatti, il gap sembra non dipendere da Ca . Il gap, inoltre, così come il rapporto tra la velocità della goccia e la velocità media del fluido, non dipende da K per $K > 0.8-0.9$, così come riportato anche dal lavoro di Ho & Leal.

Nello stesso lavoro di King ed Olbricht vengono anche indagate le modalità di rottura delle gocce. Per $\lambda < 1$, la rottura avviene tramite il

fatto che la coda posteriore della goccia rientra nella goccia stessa lungo il proprio asse, attraverso l'ingresso di un jet della fase dispersa. La zona di rientro aumenta di spessore portando alla rottura ed all'ingresso di gocce della fase esterna nella goccia in flusso. Per $\lambda \sim 1$ invece, la goccia si rompe allungandosi nella direzione assiale, anche se in alcuni casi è stata visto contemporaneamente il fenomeno della penetrazione della fase esterna nella goccia descritto prima. Riguardo tale fenomeno, simulazioni numeriche di Chi per $\lambda > 1$ suggeriscono che per valori sufficientemente alti di Ca, la lunghezza della goccia aumenta indefinitamente, anche se i risultati di questo lavoro non riescono a risolvere esattamente la forma nella zona posteriore della goccia.

1.6 MOTIVAZIONI ED OBIETTIVI

Dall'analisi della letteratura clinica si può notare come in patologie in cui è coinvolta la deformabilità eritrocitaria si intervenga oggi soltanto a livello macroscopico, cercando di superare il problema senza però risolverlo, accettando effetti collaterali di diversa specie ed entità. Poca attenzione è concessa a ciò che, inerentemente alle patologie su descritte, avviene a livello microscopico, lì dove si annida l'origine del problema. Tale approccio clinico è dovuto ovviamente anche ad una grossa carenza nella letteratura scientifica di dati sulla deformabilità eritrocitaria, specie in casi patologici.

Modelli sperimentali del comportamento reologico e fluidodinamico degli eritrociti rivestono inoltre una notevole importanza in molte applicazioni biotecnologiche, come ad esempio il

testing di protesi cardiovascolari. Ciò che si utilizza attualmente per testare questi dispositivi è una semplice soluzione di acqua e glicerina, avente in comune con il sangue la sola viscosità cinematica, ma con comportamento reologico, meccanico e fluidodinamico ben diversi. Finora il comportamento fluidodinamico del sangue è stato prevalentemente analizzato come fenomeno d'insieme, mentre le dimensioni in gioco hanno impedito un'analisi fluidodinamica locale, che permettesse ad esempio di capire come le interazioni tra i globuli in flusso influenzino la fluidodinamica degli stessi. Questi aspetti ci conducono quindi a riassumere gli obiettivi di questo lavoro:

- Messa a punto di una metodica sperimentale che consenta di analizzare velocità e morfologia durante il flusso in microcapillari sia di campioni sani che malati.
- Messa a punto di un sistema modello per la valutazione del comportamento fluidodinamico del flusso eritrocitario.

Per quanto riguarda il primo aspetto si procederà utilizzando due differenti metodologie. Il primo metodo si baserà sull'utilizzo di un gel di agarosio, materiale elastico, trasparente e caratterizzato da un indice di rifrazione all'incirca pari a quello dell'acqua, che permette di non indurre alcuna distorsione ottica nella visualizzazione dei capillari; inoltre tale lavoro prevede la messa a punto di una cella di flusso che permetta di creare microcapillari agevolmente. Da quanto discusso precedentemente si evince chiaramente come per la formazione di tali microcanali sia più opportuno ricorrere ad un materiale elastico

piuttosto che ad uno rigido, così da avvicinarsi quanto più possibile alle condizioni fisiologiche del microcircolo umano, e di individuare una tecnica di fabbricazione veloce e semplice per realizzare tali canali. In un'attività di ricerca è inoltre importante che le metodiche ed i protocolli in uso siano quanto più possibile economici e soprattutto riproducibili. A questo scopo si introdurrà una seconda metodologia basata sull'utilizzo di microcapillari in silica, da alloggiare in un'apposita cella di flusso.

Tale cella di flusso dovrà essere progettata in modo tale da consentire un passaggio agevole degli eritrociti all'interno dei microcanali e l'analisi del relativo flusso tramite video-microscopia ottica. La cella, dunque, dovrà essere di dimensioni tali da poter essere inserita sul piatto del microscopio e costituita da un materiale che non induca distorsioni ottiche. Dovrà inoltre permettere la realizzazione di un opportuno dislivello della soluzione contenente i globuli rossi tra il serbatoio di alimentazione e quello di uscita collegati alla cella di flusso. Progettata la cella e generato il flusso, le immagini acquisite tramite microscopio dovranno essere elaborate ed analizzate per studiare le variazioni morfologiche dei globuli rossi sottoposti al flusso e la fluidodinamica del sangue intero. Messa a punto la metodica e l'intero apparato sperimentale si realizzerà il flusso eritrocitario all'interno dei microcanali, sia in gel di agarosio che di silica.

Per ciò che concerne il secondo aspetto invece, si studierà il comportamento di un sistema modello, partendo prima dal caso più semplice di flusso di shear (semplice) microconfinato per approdare quindi ad un sistema che permetta di studiare il flusso microconfinato

in microcapillari, situazione molto vicina a quella d'interesse. Come detto, la necessità di un sistema modello per un'analisi fluidodinamica del problema nasce dal fatto che le dimensioni degli eritrociti sono prossime alla risoluzione della microscopia ottica (micron). La scala dimensionale del sistema modello sarà, quindi, per semplicità di analisi, di due ordini di grandezza maggiore (decine di mm). Il flusso di shear semplice sarà realizzato tramite piatti paralleli, il flusso in microcapillari sarà generato tramite un sistema di pompe a siringa e microcapillari di silice opportunamente assemblati. Entrambe le metodiche di generazione del flusso saranno integrate di nuovo in un sistema di video-microscopia ottica per consentire l'analisi dei dati acquisiti.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Conservazione degli eritrociti e proprietà della soluzione fisiologica

Al fine di conservare più a lungo le proprietà reologiche dei campioni ematici, prima di effettuare l'esperimento i globuli rossi vengono trattati con una soluzione di ACD, Albumina Umana (UA) e PBS, (10 ml di ACD, 0.5 ml di albumina, 0.5 ml di PBS, 0.1 ml di sangue).

L'**ACD** è un anticoagulante, serve cioè a mantenere liquido il sangue. Ci sono voluti numerosi studi e molti anni per arrivare a definire la formulazione definitiva di questa sostanza, nata dalla necessità di conservare il sangue per poterlo trasfondere. Tentativi con sostanze e metodi diversi erano già stati fatti da numerosi ricercatori da quando la necessità e l'importanza della trasfusione sanguigna avevano cominciato ad imporsi all'attenzione generale. Si ricordano a questo proposito le esperienze di J.D.Mayor (1634 - 1693) che nel 1667 aveva cercato di rendere incoagulabile il sangue utilizzando del sale di corno di cervo e fiore di sale di ammonio, quelle di G.F.Dieffebach (1792 - 1847), che nel 1826 aveva usato della soda caustica e di B. HICHS (1825 - 1897), che nel 1868 utilizzò del fosfato di sodio. Si era cercato anche di mantenere liquido il sangue con la defibrinazione (Dieffebach, Bischoff,.) agitandolo ripetutamente con una bacchetta o con perline di vetro. Ma con la defibrinazione si avevano alterazioni

sia della componente corpuscolata che di quella plasmatica capaci di dare reazioni indesiderate, e perciò venne abbandonata. Anche l'irudina, estratta dalle sanguisughe ed usata da Landois, Setterle, Hoocken, Abel ed altri, ebbe un certo successo, ma, per le difficoltà di trovare una giusta dose e un prodotto chimicamente puro, cadde in disuso. Infine, dopo lunghe e pazienti ricerche, il prof. L.Sabbatani, scoprì agli inizi del XX secolo le proprietà anticoagulanti del citrato di sodio. L'uso di questa sostanza rimase ignorato fino al 1914, quando fu indicato quasi contemporaneamente in tre Paesi: prima da A. Hustin a Bruxelles, poco dopo da Weill e Lewisohn a New York e quindi da L. Agote a Buenos Ayres. Nel 1918 lo scienziato O. Robertson aggiunse al citrato di sodio il destrosio. Ciò consentiva la conservazione del sangue per un tempo più lungo, cioè fino a 21 giorni. La soluzione anticoagulante così ottenuta fu chiamata ACD (acido citrico-citrato-destrosio).

Attualmente, ci sono due tipi ampiamente usati di ACD:

- *La soluzione A:* contiene 22,0 g/l di citrato trisodico, 8,0 g/l di acido citrico, 24,5 g/l di destrosio;
- *La soluzione B:* contiene 13,2 g/l di citrato trisodico, 4,8 g/l di acido citrico, 14,7 g/l di destrosio.

Per ricerche di laboratorio si usano entrambe le soluzioni, mentre per la conservazione del sangue è preferibile usare la soluzione A.

➤ L' **Albumina** è la principale proteina che circola nel sangue; essa è sintetizzata dal fegato e la sua concentrazione nel corpo umano è di circa 3.5-5.0 g/dL, costituendo circa il 60% di tutte le proteine del plasma. L'Albumina contribuisce in modo determinante al

mantenimento della normale pressione osmotica del plasma, ovvero la pressione osmotica necessaria per la corretta distribuzione dei liquidi corporei nei compartimenti intervascolari e nei tessuti.

➤ Il **PBS** è una soluzione salina tamponata con fosfato (0,145 M di NaCl, 0,01 M di Fosfato) ed ha un pH di circa 7,1. Essa viene utilizzata per lavorazioni con cellule. La soluzione fisiologica così ottenuta assicura condizioni ottimali per lo studio del flusso dei globuli; essa deve essere conservata alla temperatura di 4 °C. In questo modo si riesce a mantenere inalterate le proprietà dei globuli rossi per almeno 3 giorni, anche se conviene comunque diluire il sangue poco prima di iniziare ogni prova.

2.2 Capillari in gel d'agarosio

2.2.1 Proprietà dell'agarosio e preparazione del gel

Inizialmente in questo lavoro si è scelto di usare il gel di agarosio per la generazione di microcapillari. Esso è un polisaccaride naturale lineare di elevato peso molecolare, è chimicamente inerte, trasparente e soprattutto è elastico, quindi ottimale al fine di generare capillari flessibili e non rigidi. Il' agarosio si presenta come una polvere di colore bianco, solubilizza in acqua bollente, rimanendo in questa condizione fino a che la temperatura della soluzione non si porta al di

sotto di 40 °C, temperatura alla quale si ha la formazione di un gel stabile, che può risolubilizzarsi a circa 100 °C. Al momento della gelificazione forma una matrice porosa, la cui densità è determinata dalla sua stessa concentrazione. L' agarosio utilizzato in questo lavoro è il *Certified Molecular Biology Agarose*, prodotto dalla Bio-Rad, il quale ha un peso molecolare molto alto, presenta una struttura del gel diversa da quella tradizionale, inoltre ha un contenuto molto basso di solfato (0,06%), e produce un gel con una resistenza molto alta (gel strength = 2000 g/cm²) facile da maneggiare anche alle basse percentuali.

Il primo passo nella preparazione del gel di agarosio è decidere quale debba essere la massa finale di tale soluzione (target di soluzione) e quale debba essere la concentrazione in peso di agarosio in essa. La concentrazione scelta dopo svariate prove è il 3,5%. Noti questi due valori, sono univocamente determinate le quantità di agarosio e di acqua da miscelare. A questo punto si può procedere con la preparazione vera e propria. La soluzione va preparata in un beaker nel quale si pone un magnete, che garantisce l'agitazione della soluzione, e la soluzione richiesta (di cui è stata fatta preventivamente una pesata) che verrà chiusa con un foglio di carta di alluminio per evitarne l'evaporazione. Il recipiente va, poi, posto su un agitatore a 100°C: dopo circa 15 min, quando la soluzione inizia a bollire e diventa trasparente, l'agarosio è completamente solubilizzato. A questo punto, si toglie il beaker dall'agitatore e, grazie ad una termocoppia immessa direttamente nella soluzione, si misura la sua temperatura. Si aspetta circa 10 minuti, tempo necessario affinché

vengano raggiunti i 50°C, temperatura alla quale il gel è ancora in grado di prendere la forma desiderata.

2.2.2 La cella di flusso per capillari in gel di agarosio

La cella di flusso è stata progettata in modo tale da consentire un'agevole creazione dei microcapillari e l'analisi del flusso di globuli rossi tramite video-microscopia ottica. La cella, dunque, deve essere di dimensioni tali da poter essere inserita sullo stage motorizzato del microscopio (Zeiss Axiovert 100) e costituita di un materiale che non induca distorsioni ottiche. Deve inoltre permettere la realizzazione di un dislivello tra il serbatoio di alimentazione della soluzione contenente i globuli rossi ed il microcapillare entro il quale i globuli fluiranno.

La cella progettata in questo lavoro è costituita di 4 parti fondamentali (Figura 24):

- una base di plexiglass
- una lastra di vetro
- uno spaziatore di gomma
- una lastra di plexiglass, che funge da copertura

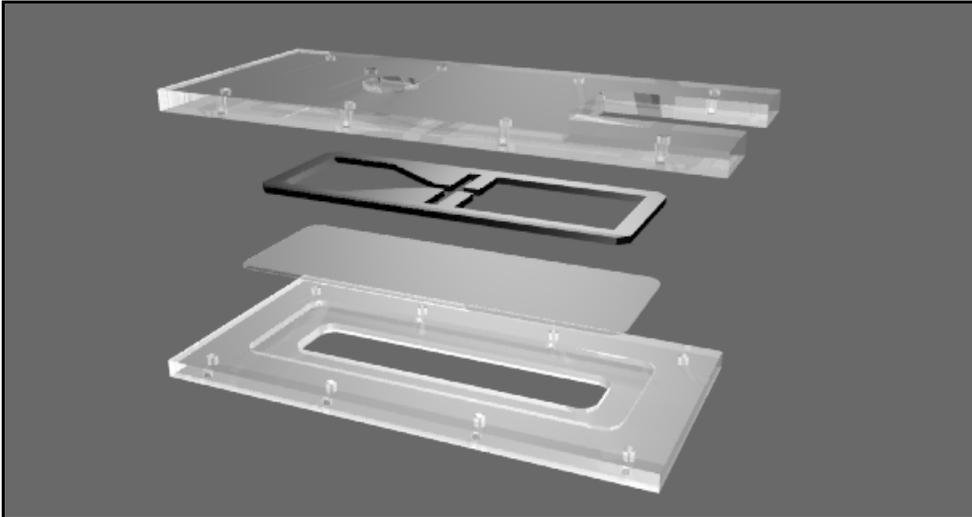


Figura 24: Componenti della cella di flusso

La base, di plexiglass trasparente, è di forma rettangolare. Opportunamente scavata, per potervi alloggiare al suo interno una lastra di vetro e uno spaziatore di gomma, è forata sulla parte inferiore per far sì che l'obiettivo del microscopio veda solo il vetro e non il plexiglass. Sui due lati lunghi della base ci sono 8 fori, 4 per lato, di 3 mm di diametro, che servono ad alloggiare le viti per la chiusura. In Figura 25 è riportato il progetto della base, realizzato con il programma AUTOCAD 2004.

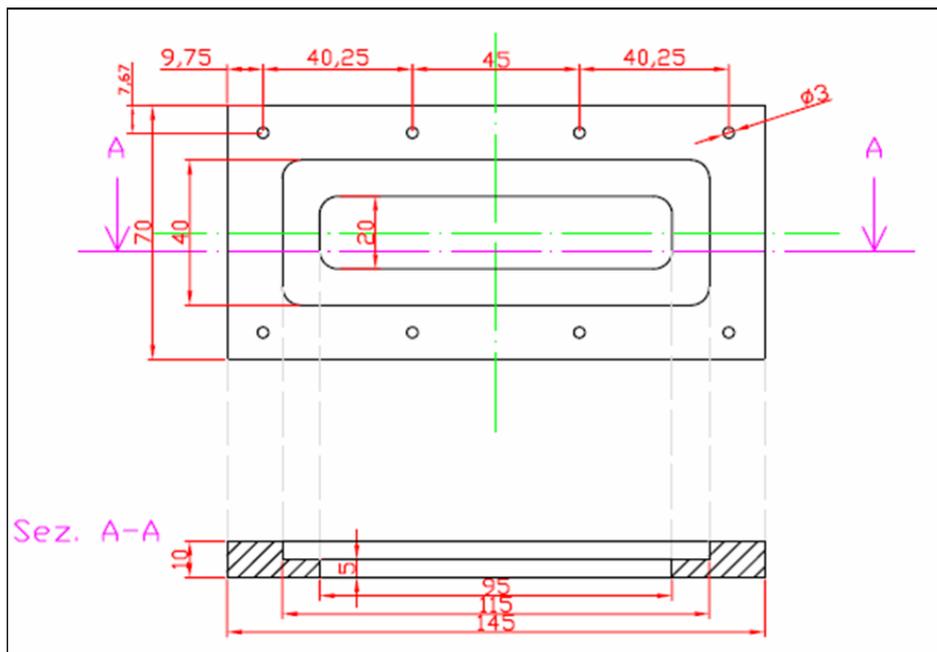


Figura 25: Disegno in AUTOCAD della base della cella

La lastra di vetro è rettangolare, di spessore tale da consentire l'utilizzo di obiettivi *long working distance* (a lunga distanza di lavoro) e dimensioni tali da poggiarsi sullo scavo della base e chiudere la parte inferiore aperta. Questa lastra di vetro rappresenta la base vera e propria della cella, nel senso che la soluzione di globuli rossi sarà contenuta tra questa e il plexiglass della lastra superiore. Sulla lastra di vetro sono inoltre fissati due pezzetti di gomma di 1 mm di spessore che, come si vedrà in seguito, servono a non far poggiare direttamente sul vetro il filo che servirà alla creazione del capillare.

Lo spaziatore di gomma è il componente più importante della celletta di flusso. Prima di tutto, la sua particolare geometria, come si può osservare in Figura 26, è caratterizzata da un tratto convergente, che serve ad "accompagnare" la soluzione di eritrociti verso l'imbocco del microcapillare, che si trova nella zona a croce dello spaziatore, contrassegnata dalla lettera B.

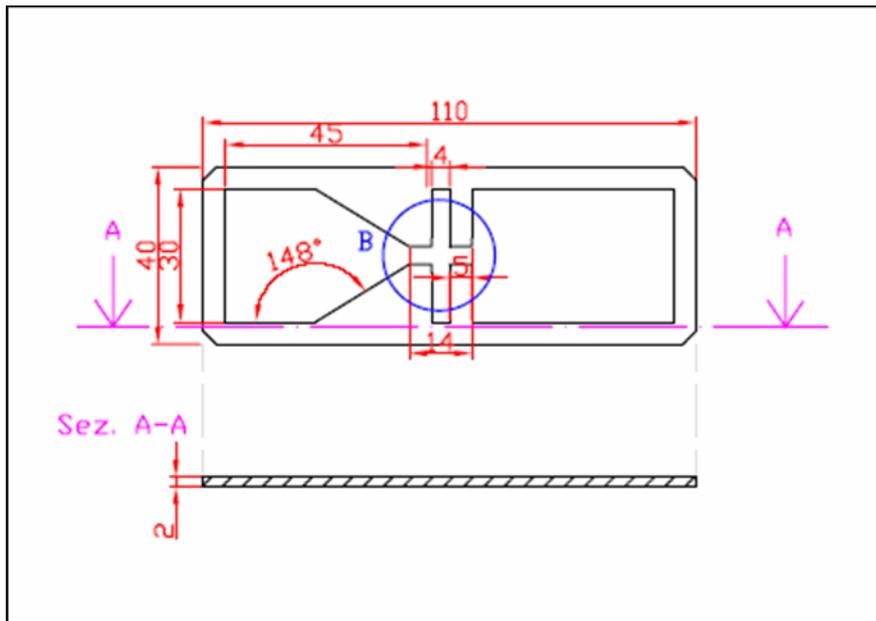


Figura 26: Disegno in AUTOCAD dello spaziatore di gomma

In secondo luogo, è fatto di gomma (materiale inerte nei confronti dell'agarosio), e, sempre grazie alla sua geometria particolare, ricopre tutta la zona perimetrale dello scavo e soprattutto la zona centrale; questo serve ad assicurare l'adesione tra la gomma stessa e lo strato superiore di plexiglass: è importante, infatti, che ci sia perfetta tenuta e, cioè, che la cella non abbia perdite in alcuna zona, perché altrimenti i globuli rossi stenterebbero ad entrare in un canale di dimensioni così piccole, quali sono quelle dei microcapillari che devono attraversare.

Infine, la lastra superiore di plexiglass trasparente ha due funzioni: la prima è di chiudere la cella, funge cioè da vero e proprio "coperchio", avendo 8 fori posti in corrispondenza di quelli della base, per far sì che si possano inserire 8 viti e, con altrettanti dadi, sigillare bene tutto; la seconda, e più importante, è quella dettata dalla sua forma (Figura 27). E' presente un foro filettato che ha, inizialmente, la

funzione di contatto con l'interno, permette cioè di infilare le lame di una forbicetta per tagliare il filo (per la creazione del capillare), e dopo serve ad avvitare un portatubi, al quale è fissato un tubo di gomma in cui scorrerà la soluzione di eritrociti.

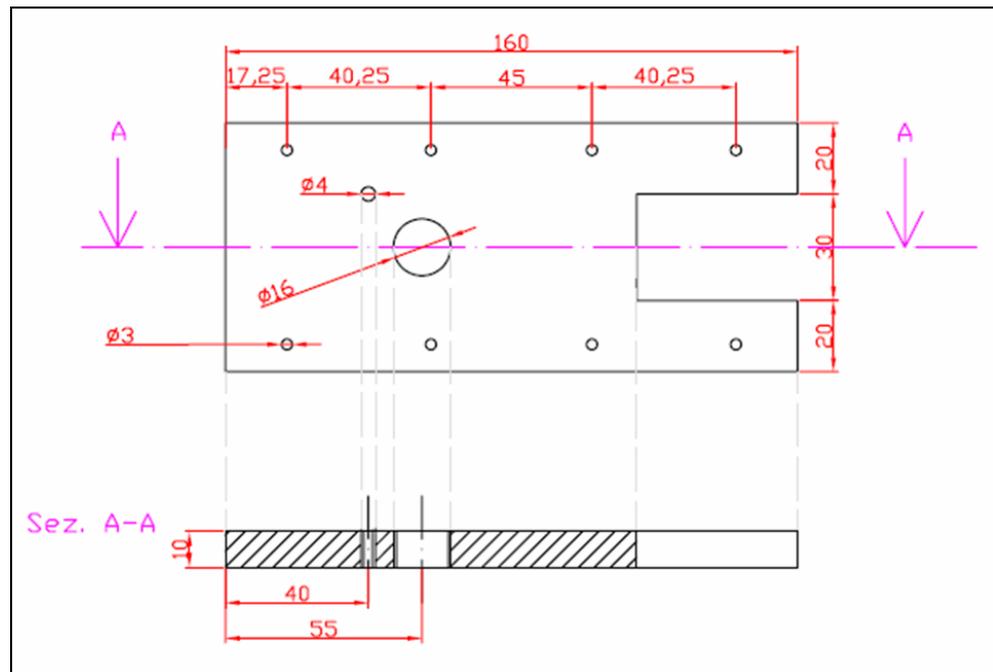


Figura 27: Disegno in AUTOCAD della parte superiore della cella

C'è poi un altro foro, sempre filettato, ma di diametro minore, che serve per far uscire l'aria, dopo aver caricato la cella con la soluzione: la presenza di bolle d'aria dentro la celletta è, infatti, un evento indesiderato, perché impedisce il normale fluire dei globuli verso il capillare. Infine, la zona di destra, a forma di ferro di cavallo, lascia una parte aperta verso l'esterno ed è usata per tirare via il filo ed ottenere così il capillare.

2.2.3 Creazione dei microcapillari

La cella di flusso, come si è appena descritto, è strutturata in modo tale da poter accogliere al suo interno e in particolare nella zona centrale, (Fig. 28), il gel di agarosio. Per creare il microcapillare si è usato un filo di tungsteno ricoperto d'oro, prodotto dalla Goodfellow e disponibile in vari diametri; in particolare, in questo lavoro sono stati usati fili da 5, 10 e 50 μm . È importante che il filo sia ricoperto d'oro prima di tutto perché si riesce a vedere meglio, rispetto ad un normale filo metallico, date le dimensioni, e poi perché è più resistente. Esso deve essere teso al centro della celletta, fissando uno dei due capi su uno dei due pezzetti di gomma di spessore di 1 mm e l'altro capo sulla parte del perimetro dello spaziatore di gomma che resta aperta. Questa operazione è molto delicata, perché il filo è chiaramente fragilissimo e difficile da vedere e maneggiare. C'è bisogno di lavorare con una lente di ingrandimento e una luce opportuna, e di porre la cella su un foglio scuro, per distinguerlo meglio. Bisogna usare inoltre una pinzetta e dei guanti per evitare di sporcare il filo e prima di stenderlo si deve pulire con un pezzetto di carta intriso di isoottano per eliminare qualsiasi tipo di corpuscolo sulla sua superficie, come ad esempio un granello di polvere. È molto importante che il filo sia ben pulito al fine di ottenere un capillare non ostruito. In genere, questa operazione di pulitura e fissaggio del filo sulla cella viene effettuata mentre si aspetta che il gel di agarosio, preparato come descritto precedentemente,

raggiunga una temperatura di circa 50°C (più alta cioè della temperatura di gelificazione, 40°C): in queste condizioni, infatti, il gel è ancora plasmabile nella forma desiderata.

Quindi, steso il filo e preparato il gel, si preleva con una siringa da 1 ml senza ago circa 0,1 ml di gel che, sempre con la stessa siringa, viene iniettato nella zona a croce dello spaziatore, sopra il filo. Nelle condizioni in cui è il gel non è ancora completamente gelificato, l'agarosio si andrà a depositare tutto intorno al filo. Dopo aver depositato il gel sul filo, bisogna immediatamente chiudere la cella con la lastra superiore, facendo ben attenzione che il gel aderisca sia alla lastra superiore che ai quattro vertici della zona a croce dello spaziatore, sempre per evitare perdite.

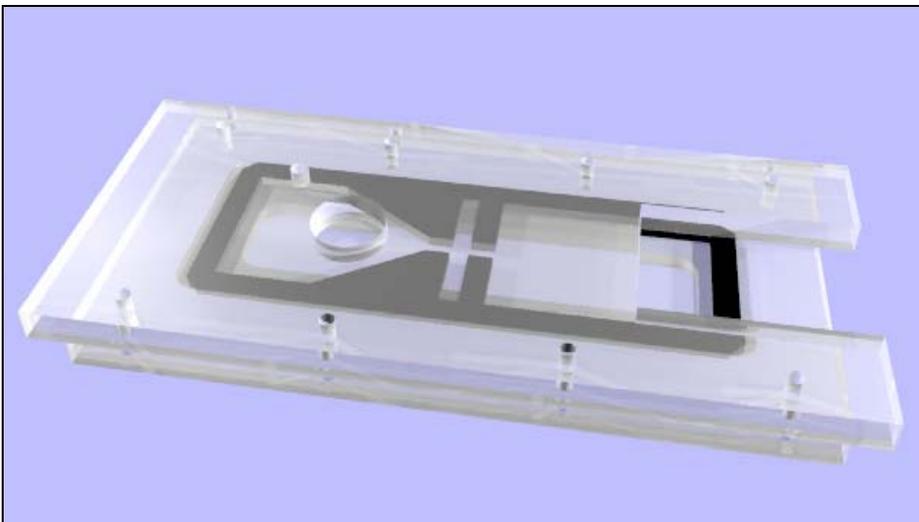


Figura 28: Celletta di flusso chiusa.

Una volta chiusa la cella, si avvolge con del parafilm per chiudere tutte le zone aperte e si conserva a 4°C per 8 minuti, per far avvenire la gelificazione completa. Si riporta quindi la celletta a temperatura

ambiente, si pone sullo stage motorizzato del microscopio e si cerca il punto del gel dove si trova il filo visionando non direttamente al microscopio, ma sul video, grazie al programma *Measurement automation* della *National Instruments*.

Questa fase richiede un po' di pazienza, perché non è facile trovare un filo di, per esempio, 5 μm in una zona di circa 5 mm di diametro. Dopo aver visualizzato il filo sul monitor del pc, si può tagliare attraverso il foro di 8 mm di diametro e poi tirarlo via dal gel, molto lentamente; in questo modo nel gel rimane una zona tubolare vuota: il microcapillare. La Figura 29 mostra come appare il filo nel gel di agarosio prima di essere “sfilato”. L'alone nero indica la presenza di aria, che ha indice di rifrazione 1,0003; la parte chiara è il gel di agarosio in mezzo al quale si distingue chiaramente il filo.

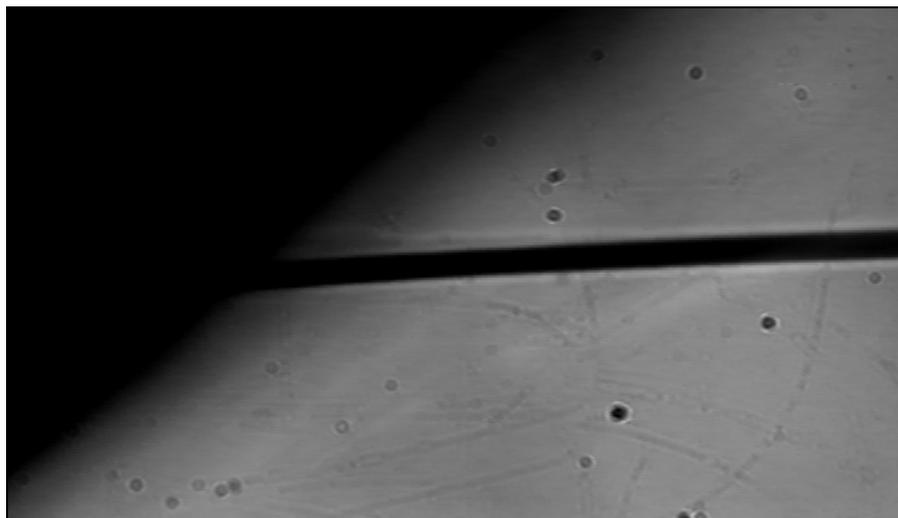


Figura 29: Filo nel gel di agarosio, ottica 20x2x1x

2.3 Capillari di silica

Il metodo di creazione di microcapillari in agarosio, per quanto economico ed innovativo, ed in grado di condurci ai primi risultati sull'analisi qualitativa della capacità di deformazione di globuli sani e patologici sottoposti a flusso, non ha pienamente soddisfatto dal punto di vista della riproducibilità, specie per ciò che concerne la creazione di condotti di dimensioni inferiori a quella eritrocitaria. Tali capillari infatti, sono fortemente soggetti ad otturazione al momento della creazione degli stessi. La lunghezza dei canali generati all'interno della cella è infatti di diverse centinaia di micron, estensione lungo la quale immancabilmente qualche piccola impurità (anche polvere), inevitabilmente presente, ottura il condotto. Ciò ha reso gli esperimenti non sufficientemente riproducibili ed ha inoltre reso impossibile la "pulizia" del capillare, necessaria per riutilizzarlo in modo da confrontare il comportamento di globuli sani e patologici nelle stesse condizioni sperimentali.

Ai capillari generati tramite gel di agarosio, si è deciso quindi di affiancare microcapillari di silica reperibili in commercio, con diametri interni di 5 e 6,6 micron, prodotti dalla Polymicro Technologies.

2.3.1 La cella di flusso per capillari di silica

Tale dispositivo è costituito da:

- una base di plexiglass trasparente e di forma rettangolare;
- un vetrino di dimensioni 35x60 mm;
- uno spaziatore di gomma;
- una lastra di plexiglass che funge da copertura.

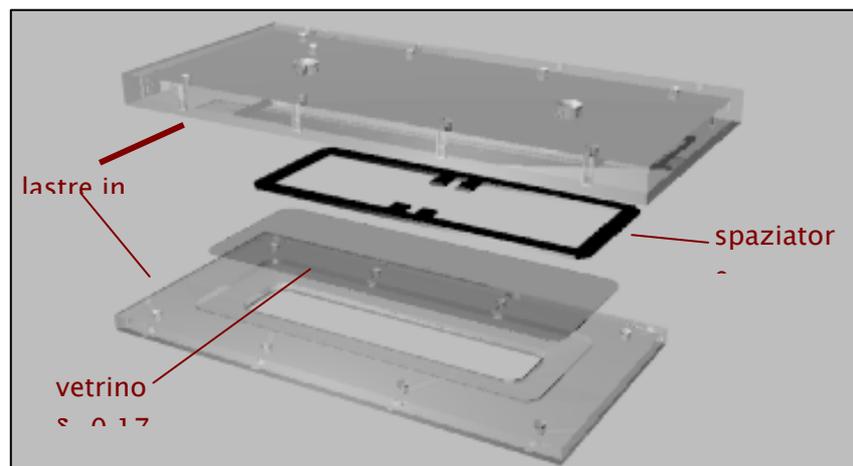


Figura 30: Costituenti della cella di flusso

Innanzitutto si selezionano i capillari di silice che si vogliono utilizzare, si tagliano e si pongono in una campana da vuoto per circa un'ora per eliminare l'aria al loro interno, visto che questa ostacolerebbe il flusso degli eritrociti. Nel frattempo si prepara la cella di flusso. La base, di plexiglass trasparente, è di forma rettangolare, è forata per fare in modo che l'obiettivo veda solo il vetro e non il plexiglass ed è opportunamente scavata, per potervi alloggiare al suo interno un vetrino, da 35x60mm e spessore 0.14 mm. Sui due lati lunghi della base ci sono 8 fori, 4 per lato, di 3 mm di diametro, che servono ad alloggiare le viti per la chiusura.

Sul vetrino, più o meno al centro, si attacca un pezzetto di scotch bioadesivo sul quale si fissano i microcapillari. Su questi ultimi si pone un pezzo di PDMS (commercialmente *SYLGARD 184*), un silicone elastomero che grazie alle sue proprietà di inerzia chimica, elasticità e trasparenza è ottimo per fissare ed osservare i capillari. Sul vetrino viene posto uno spaziatore di gomma, opportunamente sagomato in modo che il PDMS venga posto in uno spazio scavato della gomma e venga bloccato dalla stessa. Lo spaziatore ha anche la funzione di aderire alla base superiore di plexiglass per evitare perdite che falserebbero i risultati. Oltre agli 8 fori già citati ce ne sono due filettati di cui uno serve ad avvitare un portatubi, mentre l' altro, di diametro minore, serve per far uscire l'aria dopo aver caricato la cella con la soluzione. Questo è indispensabile in quanto la presenza di bolle d'aria anche dentro la celletta è un evento indesiderato, perché impedisce il normale fluire dei globuli verso i capillari.

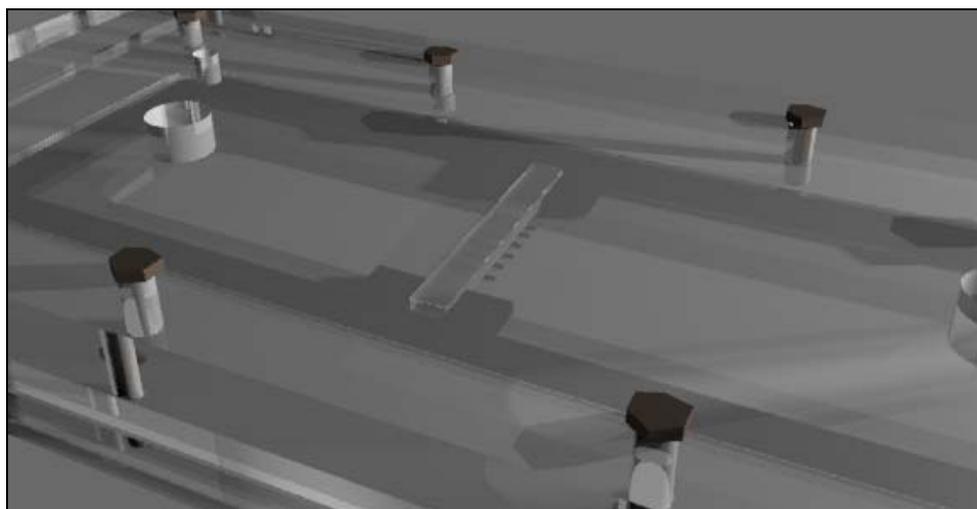


Fig 31: Cella di flusso chiusa

La cella di flusso è stata progettata in modo tale da consentire un'agevole sistemazione dei microcapillari e l'analisi del flusso di globuli rossi tramite video-microscopia ottica. Infatti è di dimensioni tali da poter essere inserita sullo stage motorizzato del microscopio ed è costituita di un materiale che non induce distorsioni ottiche.

2.4 Apparato sperimentale 1: analisi del flusso eritrocitario

Per l'osservazione del flusso di globuli rossi nei microcapillari è stato utilizzato un microscopio ottico rovesciato Zeiss a luce trasmessa, modello Axiovert 100. La messa a fuoco del microscopio avviene tramite il movimento dell'obiettivo invece che del tavolo portaoggetti ed è effettuata tramite un sistema motorizzato (Ludl Inc.). Esso è costituito da un motore passo-passo che ingrana sulla ghiera di messa a fuoco grossolana del microscopio. L'obiettivo generalmente utilizzato nello studio dei microcapillari di agarosio è: ZEISS LD Achroplan 20x/0.40 Korr Ph2. Si tratta di un obiettivo caratterizzato da grandi distanze di lavoro, per mettere a fuoco all'interno dello strato di gel di agarosio.

Nel caso dei capillari di silica è stato usato un obiettivo ZEISS LD Achroplan 100x. Per incrementare la potenzialità del microscopio in alcuni casi è stata aggiunta una lente aggiuntiva (Optovar Zeiss con

ingrandimento 2.5x); è inoltre presente uno zoom che permette di aggiungere un fattore di ingrandimento che va da 0.5x a 2x.

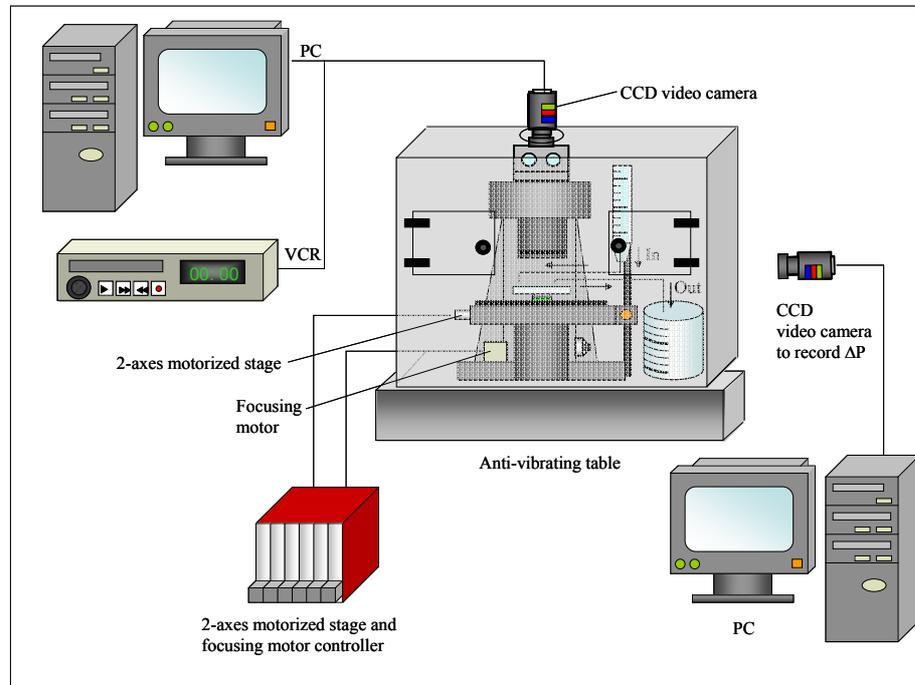


Figura 32: Apparato sperimentale

Il portaoggetti è montato su una piastra motorizzata, che ne permette la traslazione lungo due assi ortogonali. Sia il motore della messa a fuoco (movimento lungo z) che quello della piastra portaoggetti (movimenti lungo x ed y) sono comandati da un controllore (Mac2000 LUDL Inc.). pilotabile via software tramite la porta seriale da computer con programmi scritti in ambiente LabView versione 6.1.

In ogni esperimento la temperatura è stata tenuta a 37°C mettendo il microscopio e la cella di flusso, compreso la siringa e il beaker di uscita, in un cage di plexiglass in cui vi era un sistema termostatico ad aria basato su un controllore PID (Figura 32).

Le immagini vengono acquisite in tempo reale e digitalizzate in tempi successivi all'esperimento da videocassetta. Il segnale video proveniente dal microscopio viene trasmesso con una telecamera analogica Hitachi in bianco e nero CCD sia ad un video registratore che al calcolatore tramite un frame grabber. A valle dell'acquisizione, le immagini vengono digitalizzate tramite il suddetto frame grabber, che acquisisce 25 frame al secondo. Per ciò che concerne il dettaglio sull'acquisizione delle immagini, si rimanda all'apposito paragrafo.

2.4.1 Generazione del flusso eritrocitario in microcapillari

Una volta montata la cella, si avvitano i portatubi nei fori filettati di entrata e uscita. I portatubi sono a due uscite, una filettata che viene avvitata al foro di 8 mm di diametro e una liscia alla quale è fissato il tubo di gomma trasparente di diametro di circa 3 mm. Il tubo di entrata, a sua volta è collegato all'altro estremo ad una siringa fissata ad un'asta verticale tarata, in modo da avere sotto controllo il battente, mentre il tubo di uscita è collegato ad un beaker, posto su una piattaforma che trasla verticalmente, nel quale fluisce la soluzione di eritrociti.

Il pelo libero della siringa e del beaker creano il battente al quale è sottoposto il flusso dei globuli rossi; infatti dalla Legge di Stevino ($p = p_0 + \rho gh$) si ha che la pressione aumenta linearmente con il dislivello.

Nel caso della nostra cella il livello di profondità rispetto cui è misurata la profondità h (battente) è dato dalla differenza dei rispettivi peli liberi della siringa e del contenitore. La pressione viene quindi variata spostando verticalmente la siringa lungo l'asta, oppure modificando l'altezza del contenitore rispetto al piano di lavoro.

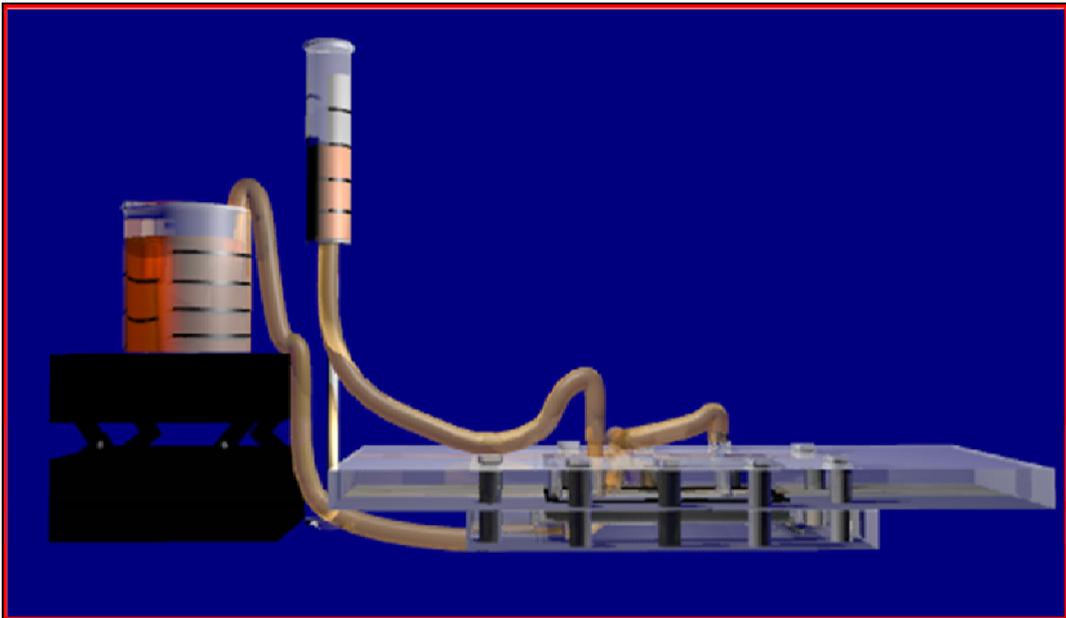


Figura 33: Cella di flusso.

A questo punto è possibile caricare la cella; inizialmente si immette nella siringa una soluzione fisiologica (sodio-cloruro 0,9%) per pulire i capillari da eventuali impurità; una volta che questa è arrivata all'imbocco della celletta si avvita il portatubi relativo all'ingresso assicurandosi che non vi siano bolle d'aria, dopodiché si lascia fluire la soluzione all'interno dei capillari finché non arriva al foro di uscita, nel quale si avvita il portatubi corrispondente, che si collega al tubo di gomma. Nel momento in cui la soluzione fisiologica esce dal tubo, si pone quest' ultimo nel beaker creando così un battente. Una volta che la cella è pulita si immette la soluzione di eritrociti e si studia il flusso nei microcapillari.

2.4.2 ACQUISIZIONE ED ANALISI DELLE IMMAGINI

(Apparato Sperimentale 1)

Lo studio dei parametri relativi alla deformazione dei globuli rossi durante il flusso nel microcapillare è stato effettuato al calcolatore sulle immagini a disposizione in formato digitale acquisite in tempo reale o sulle immagini digitalizzate in tempi successivi all'esperimento da videocassetta. In questa sede si descriveranno l'hardware ed il software utilizzati nel presente lavoro di tesi.

Il segnale video proveniente dal microscopio viene trasmesso con una telecamera analogica in bianco e nero CCD sia ad un video registratore VCR che al calcolatore tramite un frame grabber. La telecamera è stata prodotta dalla Hitachi, modello KP-M1AP. Le sue caratteristiche principali sono:

Elemento sensibile da 2/3" con 768x493 pixel con definizione di 525 linee TV.

Elevato rapporto segnale/rumore (56 dB)

Circuito di controllo automatico del gain.

Shutter elettronico con tempi di esposizione da 1/100 a 1/10.000 di secondo.

Sensibilità 400 lux.

Illuminazione minima 0,3 lux.

La telecamera è connessa al microscopio tramite un raccordo a passo C montato su tubo fotografico dotato di prisma, in maniera tale da consentire anche la contemporanea osservazione tramite oculare. Il flusso di immagini rilevate dalla telecamera è registrato su supporto a nastro analogico tramite video registratore e in seguito digitalizzato tramite una scheda di acquisizione (frame grabber National Instrument IMAQ PCI 1409). L'immagine digitale prodotta dalla scheda è costituita da una matrice di 768x512 interi (pixel), di valore compreso tra 0 e 255. Essi indicano i livelli di grigio di ciascun punto dello schermo. Data la linearità del segnale prodotto dalla telecamera CCD, si ritrova una corrispondenza diretta tra il valore del pixel e la luminosità del corrispondente punto dell'immagine. La particolarità dell'hardware a disposizione sta nel poter regolare il contrasto direttamente sul segnale analogico. Tramite opportuni potenziometri si può infatti alterare direttamente l'offset e il gain del segnale in ingresso. Le immagini possono anche essere acquisite direttamente in formato digitale, controllando l'acquisizione mediante il software di analisi della immagini *Image Pro Plus 4.5* per Windows.

La gestione del frame grabber viene effettuata mediante apposito software che, oltre a consentire un controllo interattivo del frame grabber, è corredato da una biblioteca di routine standard per l'analisi delle immagini in linguaggio C. Le routine possono essere chiamate nell'ambito dello stesso software, ampliandone le potenzialità di base. Il software utilizzato è implementato su un personal computer Dell. Le immagini sono visualizzate tramite un monitor Sony Trinitron 17'' ad alta risoluzione, per avere una visione on line di ciò che accade

durante l'esperimento. Il processo di digitalizzazione delle immagini registrate su videocassetta consiste di due operazioni: prima di tutto si scelgono delle sequenze dell'esperimento che risultano essere per qualche motivo d'interesse per i nostri fini, ad esempio il passaggio di un globulo rosso attraverso un restringimento del capillare (squeezing), la formazione di *rouleaux* o anche il normale flusso dei globuli. In secondo luogo, dopo aver scelto una sequenza, si procede alla acquisizione di tali immagini tramite il suddetto frame grabber, che acquisisce 25 frame al secondo. La serie di immagini in formato digitale viene poi tradotta in filmato tramite delle macro precedentemente sviluppate.

Il procedimento di analisi della sequenza filmata si può suddividere nel modo seguente:

- Acquisizione di singole immagini.
- Valutazione delle grandezze geometriche fondamentali.
- Valutazione dei parametri caratteristici della deformazione.

In particolare, le grandezze geometriche di interesse risultano essere: il diametro dei globuli rossi in condizioni statiche, il diametro dei globuli rossi durante il flusso, la lunghezza dei globuli rossi durante il flusso, il diametro del capillare, il diametro del capillare in presenza di un'eventuale strozzatura. Come parametro caratteristico della deformazione si è usato l'*indice di deformazione* $DI=l/d$, dove con l si indica la lunghezza del globulo rosso in flusso in un microcapillare e con d il suo diametro (Tsukada, Sekizuka, Oshio, Minamitani, 2000).

Le misure di tali grandezze sono state effettuate tenendo conto dell'opportuno fattore $\mu\text{m}/\text{pixel}$, noto dalla calibrazione dell'obiettivo usato. Come precedentemente esposto la telecamera analogica in nostra dotazione può essere portata ad acquisire a 25 fps, ciò che costituisce fattore limitante nella fase di analisi delle immagini acquisite.

Due i limiti che ci si è trovati a dover superare:

1. Bassa velocità di acquisizione (*avendo i globuli una velocità dell'ordine del mm/s ed una dimensione di circa 8 micron, per realizzare un'analisi statisticamente significativa occorre una velocità di acquisizione delle immagini pari ad almeno il doppio del limite strumentale su esposto*)
2. Analisi manuale delle immagini, che ovviamente rallenta il lavoro (*necessità di automatizzare il processo*)

Per ovviare al primo di tali problemi si è provveduto a sostituire l'illuminazione tramite lampada alogena con illuminazione tramite lampada stroboscopia. Ogni immagine acquisita è composta infatti da due campi (*odd ed even*) acquisiti ad una frequenza di 50 Hz. La strobo, comandata attraverso un opportuno codice scritto in LabView, tramite computer e scheda di controllo, che invia alla stessa un treno di impulsi (0-5 Volt), illumina il campione con un flash di durata 6 μsec e frequenza 100 Hz, facendo così apparire nello stesso frame due volte il campione illuminato (nel nostro caso il singolo globulo). La messa a punto di questo nuovo set-up ha consentito di raddoppiare la velocità di acquisizione, 50 fps, agevolando notevolmente la capacità di analisi.

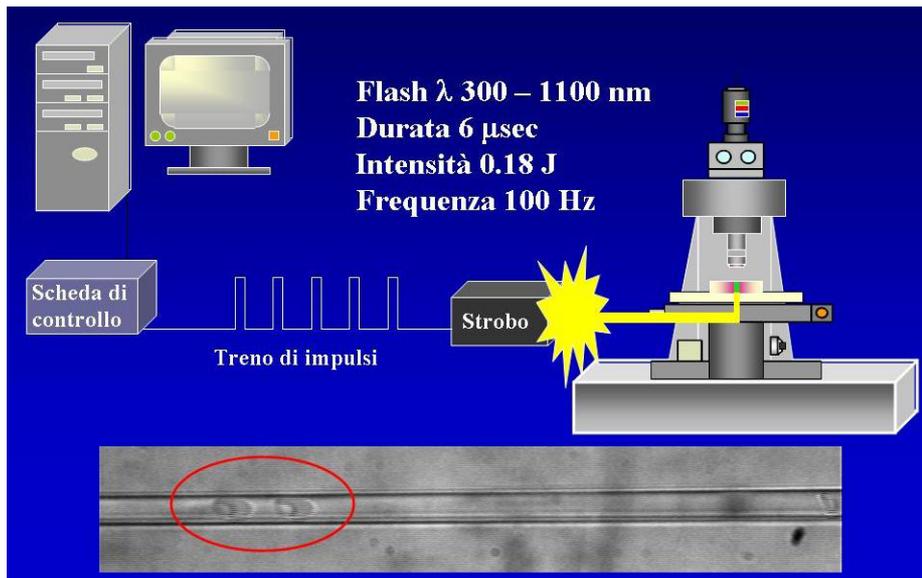


Figura 34: Schema di integrazione e funzionamento della lampada stroboscopia

In corso d'opera si è arrivati ad avere a disposizione anche una telecamera digitale, che però a piena risoluzione ha una velocità di acquisizione di circa 8 Hz. Si è provveduto quindi a scrivere in LabView un nuovo codice di comando della telecamera, che permettesse di regolare automaticamente da interfaccia finale i parametri della stessa che influiscono sulla velocità di acquisizione, che nel dettaglio sono:

- **Shutter** (tempo di esposizione), regolato al minimo (10 μs)
- **Binning**, ovvero la possibilità di accorpare dei pixel, diminuendo la dimensione e la risoluzione delle immagini, regolata a seconda dei casi ai valori 2x2 o 4x4
- **R.O.I.** (region of interest), ovvero l'acquisizione non dell'immagine a campo pieno, ma solo di una sezione di interesse (solitamente a piena larghezza si sceglievano altezze di 64 pixel su 512 dell'intera immagine)

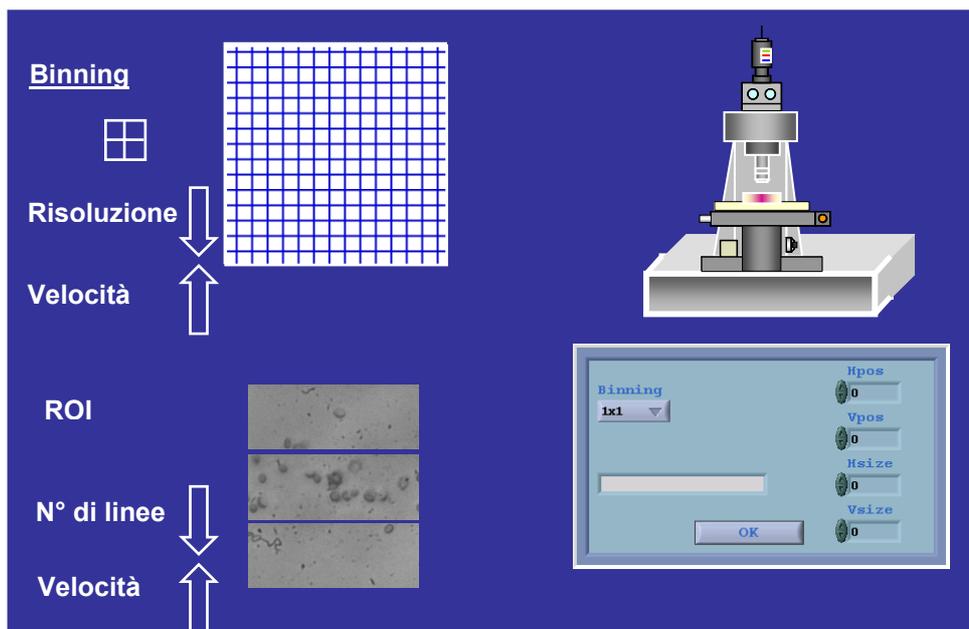


Figura 35. Descrizione di Binning e R.O.I.

I parametri così regolati, hanno consentito di fare un ulteriore passo avanti rispetto al set-up telecamera analogica + strombo, ed arrivare ad una velocità di acquisizione di 60 fps.

Risolto, o quanto meno notevolmente migliorato il problema legato all'acquisizione delle immagini, si è scritto un programma in ImagePro Plus basato sulla differenza dei livelli di grigio, che consente l'analisi automatica della velocità del singolo globulo durante il flusso in microcapillari di dimensioni paragonabili alle proprie. Il programma riconosce l'intorno del globulo e ne misura la posizione del baricentro del tempo.

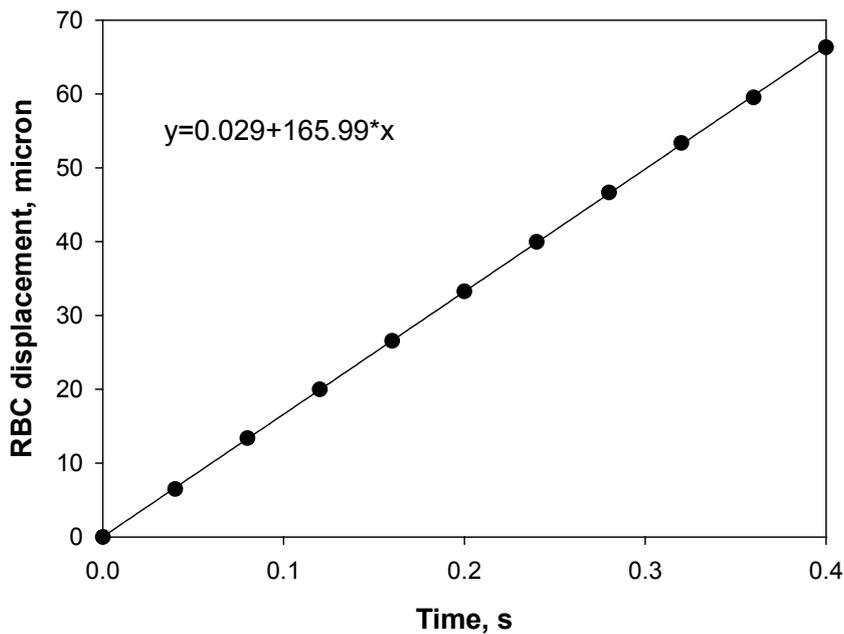


Figura 36: Grafico dello spostamento in funzione del tempo riferito al flusso del singolo globulo

2.5 Fluidi utilizzati come sistema modello

Durante questo lavoro di tesi sono state studiate le deformazioni di singole gocce Newtoniane disperse in una matrice Newtoniana in flusso di scorrimento microconfinato tra due piatti paralleli ed in flusso in capillare microconfinato. I fluidi sperimentali utilizzati sono quindi Newtoniani, miscele di Oli Siliconici (Polidimetilsilossano, PDMS Dow Corning, 20, 200, 1000, 20000, 60000, 100000 e 200000 cSt) per la goccia. I PDMS sono commercializzati allo stato liquido, si presentano trasparenti ed inodore e sono denotati con un numero che ne identifica il livello di viscosità: ad esempio il PDMS 60000 cSt ha una viscosità di circa 62.4 Pa·s a 23 °C, mentre, alla stessa temperatura la viscosità del PDMS 100000 vale circa 105 Pa·s.

Per ciò che concerne gli esperimenti in flusso di shear semplice, tutti a $\lambda=1$, per la matrice esterna è stato utilizzato un polibutene, commercialmente noto col nome di Napvis 30. Il numero indica il peso molecolare e quindi, indirettamente, il livello di viscosità.

Negli esperimenti in microcapillari invece, sono stati utilizzati fluidi a più bassa viscosità, per maggiore maneggevolezza con le pompe a siringa. Per la matrice esterna è stato utilizzato Indopol H7, che ha una viscosità di circa 0.26 Pa·s a 23 °C, mentre per la fase dispersa è stato utilizzato Silicon Oil 1000, per gli esperimenti a $\lambda=4$ ed una miscela di Silicon Oil 20 e 200 per gli esperimenti a $\lambda=1$.

Si riassumono in

Materiale	Sigla fluido	Densità (g/cm ³)	Indice di rifrazione	Viscosità Pa s
Silicon Oil 100000cSt	SO100000	0,975	1,406	105
Silicon Oil 60000cSt	SO60000	0,975	1,406	62.4
Mix SO100000cSt-SO60000cSt al 57% di SO100000cSt	G	0,975	1,406	83.1
Napvis 30	M	0,8953	1,499	83.3
Indopol H7	H7	0,95	1,41	0.26
Silicon Oil 1000		0,975	1,406	1.03
Mix SO200cSt al 57%+ SO20 cSt		0,975	1,406	0.27

Tabella le caratteristiche dei fluidi puri utilizzati per la preparazione dei fluidi sperimentali:

Materiale	Sigla fluido	Densità (g/cm ³)	Indice di rifrazione	Viscosità Pa s
Silicon Oil 100000cSt	SO100000	0,975	1,406	105
Silicon Oil 60000cSt	SO60000	0,975	1,406	62.4
Mix SO100000cSt-SO60000cSt al 57% di SO100000cSt	G	0,975	1,406	83.1
Napvis 30	M	0,8953	1,499	83.3
Indopol H7	H7	0,95	1,41	0.26
Silicon Oil 1000		0,975	1,406	1.03
Mix SO200cSt al 57%+ SO20 cSt		0,975	1,406	0.27

Tabella 3: Caratteristiche dei fluidi puri e sperimentali.

2.5.1 Modalità di preparazione dei fluidi

La coppia di fluidi utilizzata negli esperimenti è stata preparata in modo da ottenere un rapporto di viscosità unitario per gli esperimenti

in flusso di shear semplice e per parte degli esperimenti di flusso in microcapillare, e $\lambda=4$ per una seconda tipologia di esperimenti sempre in microcapillare. Si riporta a titolo di esempio la modalità di preparazione dei fluidi utilizzati per la parte relativa al flusso di shear semplice. Analoghe modalità sono state utilizzate anche per la parte sperimentale relativa al flusso in microcapillari.

L'uso di Napvis 30, dalle caratteristiche ben note e disponibile nelle quantità necessarie, come fluido della matrice esterna, ha permesso di avere un preciso e costante target di viscosità per il fluido costitutivo della goccia. Si sono miscelati SO60000cSt e SO100000cSt in quantità tali da ottenere la stessa viscosità della fase dispersa. Per determinare la concentrazione della miscela sono state utilizzate delle curve che riportano la viscosità in funzione della concentrazione in peso di uno dei due SO costituenti la miscela. Tale curva, mostrata in Figura , non è una retta poiché, durante il mescolamento dei due fluidi, si generano delle interazioni che fanno discostare il valore della viscosità della miscela da quello deducibile dalla semplice media pesata delle viscosità dei due costituenti. Per ottenere tale curva si è misurata la viscosità di varie miscele campione di SO. Successivamente, i punti sono stati interpolati con un polinomio di II grado, ottenendo una curva sperimentale continua.

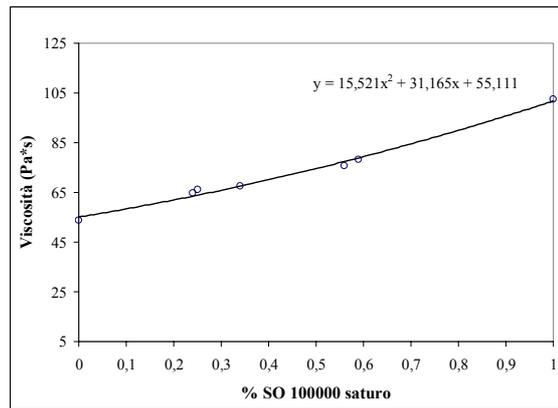


Figura 37: Viscosità di una miscela SO60000cSt-SO100000cSt.

Per ottenere la miscela di SO con viscosità uguale a quella del Napvis 30 cioè 83.3 Pa*s, sono stati mescolati SO60000cSt e SO100000cSt al 57% di SO100000cSt

La miscela si prepara in un becker o un recipiente con tappo in cui è stato posto un magnetino, precedentemente pesati per determinare la tara. Dopo aver azzerato l'indicatore della bilancia, molto accuratamente, con una scatolina, s'immettono nel recipiente le quantità calcolate dei due tipi di PDMS (in genere quello più viscoso per primo). Una volta chiuso il recipiente, lo si pone su un agitatore: l'alta viscosità dei fluidi comporta tempi di agitazione più lunghi rispetto a quelli necessari all'agitazione di campioni meno viscosi, ma, in genere, dopo alcune ore i due fluidi sono perfettamente miscelati.

Il campione sarà identificato scrivendo sul recipiente i due tipi di PDMS e la concentrazione in peso di uno dei due.

2.5.2 Caratterizzazione reologica dei campioni

2.5.2.1 Metodi di misura

Sono state effettuate misure di viscosità, usando il reometro rotazionale *CVO 120* a stress controllato della *Bohlin Instruments*, adoperando la geometria cono – piatto con angolo di 4° e diametro di 40 mm (CP $4^\circ/40$). In Figura si mostra la geometria utilizzata.

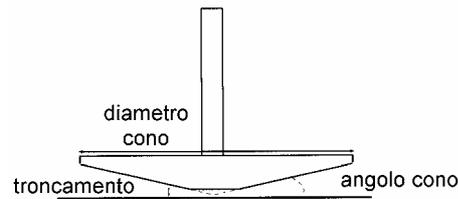


Figura 38: Geometria cono-piatto.

Durante questo lavoro si è preferita la geometria CP $4^\circ/40$ in quanto più semplice da caricare e pulire e capace di fornire risultati con un errore che non supera lo 0.3%. Il caricamento è la fase cruciale della misura: un buon caricamento prelude ad una caratterizzazione corretta ed attendibile, riferibile e ripetibile.

La geometria CP $4^\circ/40$ prevede un caricamento tale che si devono prelevare dal becker 1.3 mm di materiale, usando una siringa di vetro, in quanto una in plastica potrebbe contaminare il campione. Il materiale prelevato si deposita sul piatto del viscosimetro, in modo quanto più centrato possibile su di esso. Se nel materiale depositato sul piatto dovessero essere presenti delle bollicine, o si aspetta che vadano via da sole, o si cerca di eliminarle usando un ago. E' indispensabile ridurre al minimo il numero di bolle in quanto potrebbero pregiudicare la caratterizzazione con fenomeni di instabilità. Caricato il materiale, si abbassa il supporto del cono del reometro in vari passi, in modo che

il fluido possa adattarsi alla geometria, fino ad un gap di 150 μm , per la geometria CP 4°/40. Possono riscontrarsi le seguenti situazioni di caricamento:

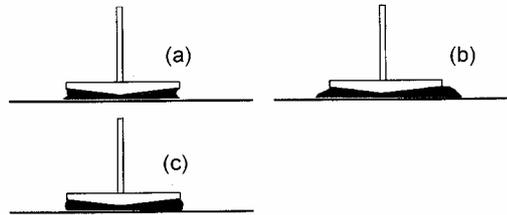


Figura 39: Situazioni di caricamento del materiale.

- a) Il materiale è insufficiente: bisogna pulire il reometro e ricaricare il materiale.
- b) Il materiale è sovrabbondante: con una spatolina si può eliminare il materiale in eccesso.
- c) Caricamento ottimale.

Caricato il materiale si procede alla sua caratterizzazione.

Le misure di viscosità, effettuate alla temperatura di 23°C, mantenuta costante da un bagno termostatico, sono condotte variando, di volta in volta, lo shear stress: quello minimo e quello massimo dipendono sia dalla geometria utilizzata sia dal materiale. Partendo da shear stress dell'ordine di 10^{-2} Pa, si arriva a shear stress dell'ordine di 10^2 Pa. Sia per valori di shear stress troppo bassi, che troppo alti si ha instabilità nella misura, che si manifesta, ad esempio, con andamenti di viscosità o sempre crescenti o sempre decrescenti. Ad ogni modo, gli shear stress sono imposti in modo da esplorare un intervallo di shear rate compreso tra 10^{-3} e 10, giacché le misure sono finalizzate ad ottenere la variazione della viscosità del fluido in funzione della shear rate che si realizza durante il flusso di scorrimento semplice durante

l'esperimento. Si considera come viscosità misurata la media dei valori forniti dallo strumento, dopo un transitorio iniziale.

2.5.2.2 Elaborazione dati

Terminata la misura, si procede con l'elaborazione dei dati. Prima di tutto si calcolano le medie, su un foglio Excel, dei dati forniti dalle misure in quanto, come detto prima, la misura della viscosità oscilla intorno ad un valor medio. Costruito, poi, il foglio di dati in *Sigma Plot*, si crea un grafico in scala logaritmica avente sulle ascisse la velocità di scorrimento, mentre sulle ordinate la viscosità. La caratterizzazione dei fluidi sperimentali utilizzati mira a:

- ✓ Verificare che la viscosità si mantenga costante con la shear rate.
- ✓ Verificare il valore di viscosità previsto.

Le misure sono state effettuate fissando una tabella di velocità di scorrimento, in modo da poter verificare che il fluido fosse perfettamente newtoniano. In Figura si mostra la viscosità, in funzione della velocità di scorrimento, per una miscela di due diversi tagli molecolari di Silicon Oil. I punti mostrano un perfetto comportamento Newtoniano del fluido.

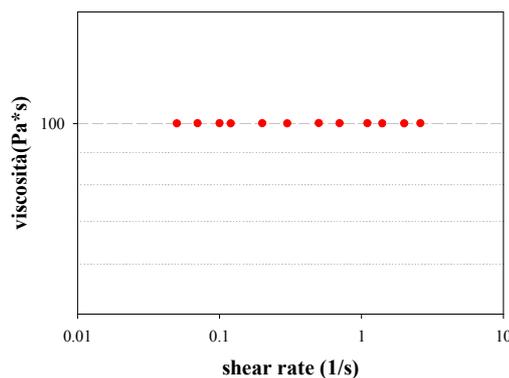


Figura 40: Diagramma della viscosità della miscela dei PDMS 100000 e 60000 al 90% di PDMS 100000 in funzione della velocità di scorrimento a 23°C.

2.6 Apparato sperimentale 2: analisi del sistema modello

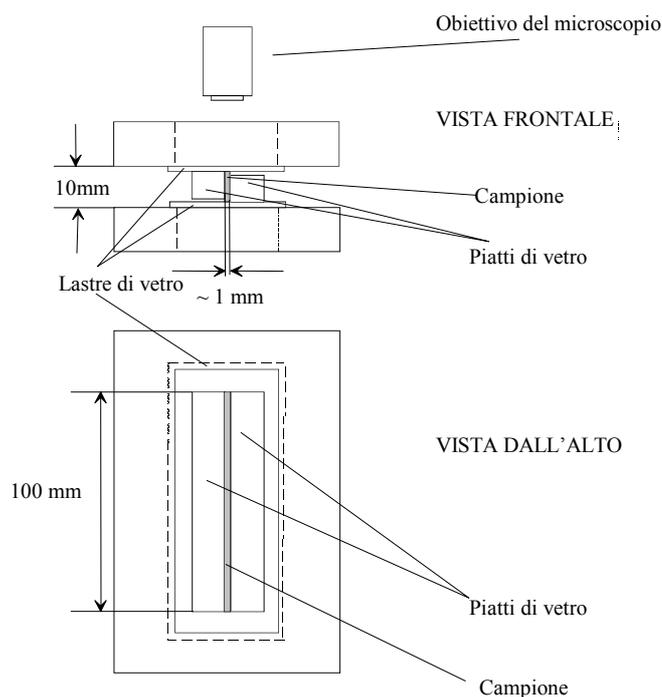
2.6.1 Apparecchiatura a Piatti Paralleli

La tipologia di piatti paralleli usata durante la campagna sperimentale è predisposta per avere un'osservazione del campione in flusso di scorrimento lungo l'asse di vorticità del campo di moto. Questo tipo di piatti paralleli è costituito da due barrette di vetro ottico, di dimensioni 10x100x10 mm (Figura), che affiancate permettono di realizzare un flusso di scorrimento ed osservare il campione lungo l'asse di vorticità. Il piano delle barrette, a diretto contatto con il fluido, è dotato di elevato grado di planarità con tolleranza Bkt7. Le due barrette sono incollate su due piastre di vetro, che sono a loro volta, incollate su supporti rigidi di bachelite. Il fissaggio dei supporti di bachelite ai movimenti micrometrici rotatori è realizzato facendo uso di viti di serraggio, per consentire la rimozione delle lastre per le operazioni di manutenzione. I supporti rigidi garantiscono l'effettiva realizzazione del flusso di scorrimento. Quello inferiore è, infatti, saldamente connesso ad un movimento rotatorio micrometrico

(Newport) che ne permette la rotazione sul piano orizzontale. Supporto e movimento micrometrico sono disposti su un tavolo portaoggetti motorizzato (LUDL Inc.). Tale ripiano portaoggetti permette la traslazione lungo due direzioni ortogonali del piano orizzontale. In tale maniera si possono effettuare le operazioni di allineamento e di caricamento del materiale, nonché la traslazione che permette la realizzazione del flusso di scorrimento nell'intercapedine. Il controllore del motore che permette il movimento del piatto inferiore (Mac2000 LUDL Inc.) è pilotato tramite la porta seriale del computer dal programma *Image Pro Plus 4.5*. Le caratteristiche del motore sono:

- ✓ Intervallo di moto X=102mm, Y=102mm.
- ✓ Risoluzione: 0.1 μm .
- ✓ Precisione: $\pm 5 \mu\text{m}$.

Il supporto superiore è invece fisso: esso è rigidamente connesso ad una serie di movimenti micrometrici tilt (Newport) che ne permettono le rotazioni intorno ad assi verticali ed orizzontali e la traslazione verticale. Controllando i gradi di libertà di tali piatti si possono disporre le superfici delle barrette e delle piastre di vetro in maniera accuratamente parallela (il gap tra di esse varia da circa 1000 μm fino a circa 100 μm).



APPARECCHIATURE A PIATTI PARALLELI

Figura 41: Piatti paralleli con vista lungo l'asse di vorticità del flusso di scorrimento;

Si descriverà adesso, dettagliatamente, il protocollo sperimentale adottato per realizzare l'allineamento tra le barrette e tra le piastre di vetro. L'allineamento si esegue attraverso la combinazione dei movimenti micrometrici manuali e motorizzati, appena descritti. Il controllo del parallelismo tra le superfici è operato mediante la seguente procedura utilizzando diverse tecniche:

- ✓ Allineamento esclusivamente ottico
- ✓ Allineamento ottico con l'ausilio del programma d'analisi delle immagini.
- ✓ Allineamento con raggio laser.
- ✓ Allineamento tramite l'interposizione di spessori calibrati.

Procediamo per passi:

1. Verifica che il piatto mobile inferiore, nel suo moto lungo l'asse x, non trasli lungo z.

A campo fisso, si muove il piatto inferiore lungo l'asse x e si verifica che la superficie del piatto di vetro o della barretta sia tutta a fuoco, cioè, alla stessa distanza focale dall'obiettivo (almeno due punti, in pratica due piccole impurezze, a, relativamente grande, distanza fra loro). La correzione focale va eseguita modificando l'angolo formato dall'asse della barretta e l'asse x, usando il tilt specifico. Questo primo passo è schematizzato in Figura :

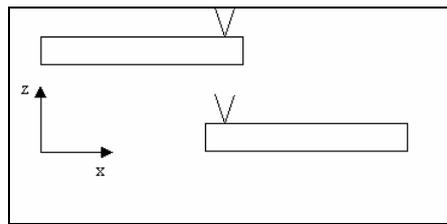


Figura 42: Allineamento della barretta mobile all'asse z.

Tramite una macro di *Image ProPlus*, denominata z-position, è possibile, misurando la distanza focale, eseguire la stessa procedura di messa a fuoco e, quindi, lo stesso tipo di allineamento descritto sopra.

2. Verifica che il piano della barretta mobile, che sarà affacciato sulla barretta fissa, scorra parallelamente all'asse x, quindi sia allineato a sé stesso.

Questa procedura si realizza disegnando con il software di analisi delle immagini *Image ProPlus* una linea, parallela allo spigolo superiore interno della barretta mobile, su una finestra di visualizzazione in tempo reale del flusso di dati proveniente dall'accoppiata microscopio-telecamera, e verificando che, muovendo la barretta lungo l'asse x,

questa rimanga parallela alla linea di riferimento (vedi Figura). La correzione va eseguita azzerando l'angolo formato dallo spigolo della barretta e la linea, usando il tilt specifico.

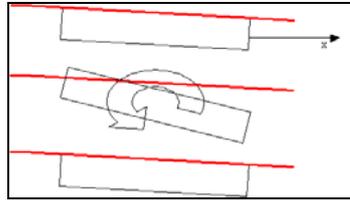


Figura 43: Allineamento del piano della barretta a sé stesso.

3. Verifica dell'allineamento all'asse z della barretta mobile.

Nel caso in cui l'esperimento dovrà essere condotto con una distanza (gap) tra le barrette molto piccola, come nel nostro caso, è necessario questo tipo di allineamento. Esso evita la presenza di molteplici riflessioni ed il peggioramento della qualità delle immagini, causati dall'interposizione dello spigolo di una delle due barrette (Figura). La correzione va eseguita realizzando l'opportuna rotazione della barretta mobile attorno all'asse x, usando il tilt specifico; in modo da ridurre d fino a circa $2\mu\text{m}$.

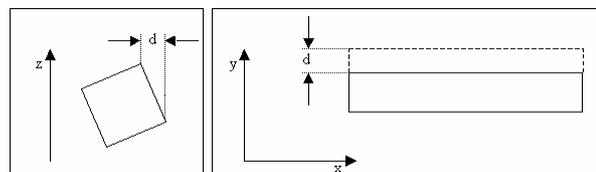


Figura 44: Allineamento all'asse z della barretta.

4. A questo punto bisogna verificare il parallelismo della barretta fissa, cioè non motorizzata, a quella mobile sia lungo l'asse x sia lungo l'asse z.

Per verificare il parallelismo delle due barrette lungo l'asse x, bisogna misurare il gap fra esse in due punti lungo l'asse x, come mostrato in Figura 45. Con movimenti rotatori micrometrici è possibile ruotare la seconda barretta per aggiustare tale allineamento. Allo stesso modo si procede per verificare ed aggiustare il parallelismo delle barrette lungo z. In questo caso bisogna misurare il gap fra le stesse a due quote differenti. Anche in questo caso, per realizzare il parallelismo, si ha a disposizione un tilt micrometrico per ruotare la barretta superiore rispetto all'asse z.

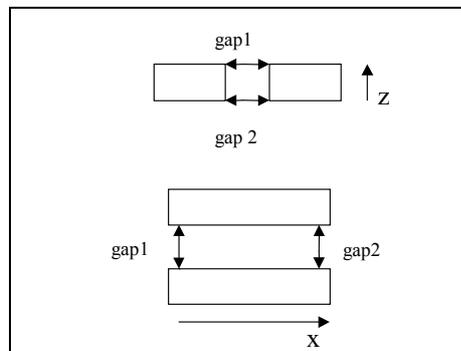


Figura 45: Allineamento delle due barrette.

5. Usando un raggio laser si allinea la barretta fissa all'asse z come la barretta mobile.

Le barrette, avvicinate stringendo sufficientemente il gap, sono investite da un raggio laser (SPECTRA-PHYSICS modello 133). Le riflessioni di tale raggio produrranno 4 punti luce di raggi riflessi dalle interfacce vetro-aria delle due barrette. Nel disegno di Figura , per chiarezza si riportano solo i raggi riflessi corrispondenti alle due superfici di vetro tra le quali si realizza il flusso di scorrimento. Individuati, quindi, i punti luce di tali raggi riflessi su una superficie bianca, piana e lontana, li si fanno sovrapporre, fino ad osservare interferenza, agendo sugli opportuni movimenti micrometrici.

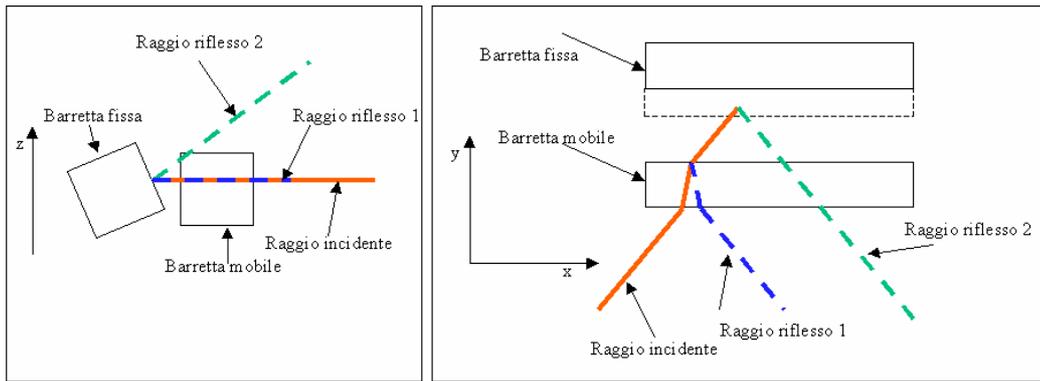


Figura 46: Allineamento tramite raggio laser.

6. L'ultimo tipo di allineamento che viene realizzato è quello che assicura una certa distanza, lungo l'asse z, della barretta fissa rispetto al piatto mobile inferiore, per evitare che questo la urti nel suo moto lungo l'asse x, o che fuoriesca troppo materiale.

Va detto che, in questo caso, è sufficiente un allineamento abbastanza grossolano, il cui scopo principale è evitare danni all'apparato sperimentale. La correzione va eseguita inserendo tra la barretta fissa ed il piatto mobile, in due posizioni relativamente lontane, due spessori calibrati, agendo sul tilt specifico per realizzare lo spazio necessario per il loro inserimento. Una volta che i piatti sono stati così allineati, si prende nota della posizione di ciascun movimento micrometrico. Durante gli allineamenti effettuati è stato verificato il parallelismo tra i due piatti con un errore che non è mai stato superiore al 2%.

2.6.2 Video microscopia ottica

Per l'osservazione della deformazione e della rottura della singola goccia soggetta a flusso di scorrimento è stato utilizzato un microscopio ottico Zeiss a luce trasmessa, modello Axioskop FS. La

principale caratteristica di tale microscopio è che la messa a fuoco è realizzata tramite movimento dello stativo invece che del tavolo portaoggetti (come in genere accade nella maggior parte dei microscopi moderni). Questa è una caratteristica fondamentale per la realizzazione degli esperimenti in quanto nel lavoro di tesi svolto il tavolo portaoggetti del microscopio è stato rimosso e sostituito dalla struttura di sostegno dei piatti. Di qui la necessità che il movimento della messa a fuoco interessi la struttura del microscopio e non il campione. La messa a fuoco del microscopio è effettuata tramite un sistema motorizzato (Ludl Inc.) che permette una precisa scansione del campione in esame. Esso è costituito da un motore passo-passo che ingrana sulla ghiera di messa a fuoco grossolana del microscopio. Gli obiettivi generalmente utilizzati sono: ZEISS Plan-Neofluar 2.5x/0.075, ZEISS Achrostigmat 10x/0.25 e ZEISS LD Achroplan 20x/0.40 Korr Ph2. Sono obiettivi caratterizzati da grandi distanze di lavoro, per mettere a fuoco all'interno del campione. Per incrementare la potenzialità del microscopio è stata aggiunta una lente addizionale (Optovar Zeiss con ingrandimento 1.25x e 1.6x), nonché uno zoom della Zeiss con ingrandimento variabile da 0.5x a 2x. Il microscopio è montato su una piastra motorizzata, che ne permette la traslazione. In tale maniera è possibile seguire le gocce durante il flusso tramite movimenti paralleli all'intercapedine. Il motore della piastra è passo-passo con uno step di 0.5 μm e corsa totale di 10 cm. Il suo controllore è pilotato dal calcolatore tramite porta seriale.

- ✓ La deformazione della goccia è filmata da una telecamera bianco/nero CCD prodotta dalla Hitachi, modello KD-ME1, già

descritta in precedenza. La telecamera è connessa al microscopio tramite un raccordo a passo C montato su tubo fotografico dotato di prisma, in maniera tale da consentire anche la contemporanea osservazione, tramite oculare. Alla telecamera è connesso un videoregistratore Panasonic AG-7355 Super VHS con risoluzione di circa 400 linee TV orizzontali e con rapporto S/N di 45 dB.

L'insieme delle apparecchiature utilizzate è montato su di un tavolo anti-vibrazione (Newport) che consente di migliorare notevolmente la qualità delle immagini prodotte. Una schematizzazione complessiva dell'apparato sperimentale è presentata in

Figura .

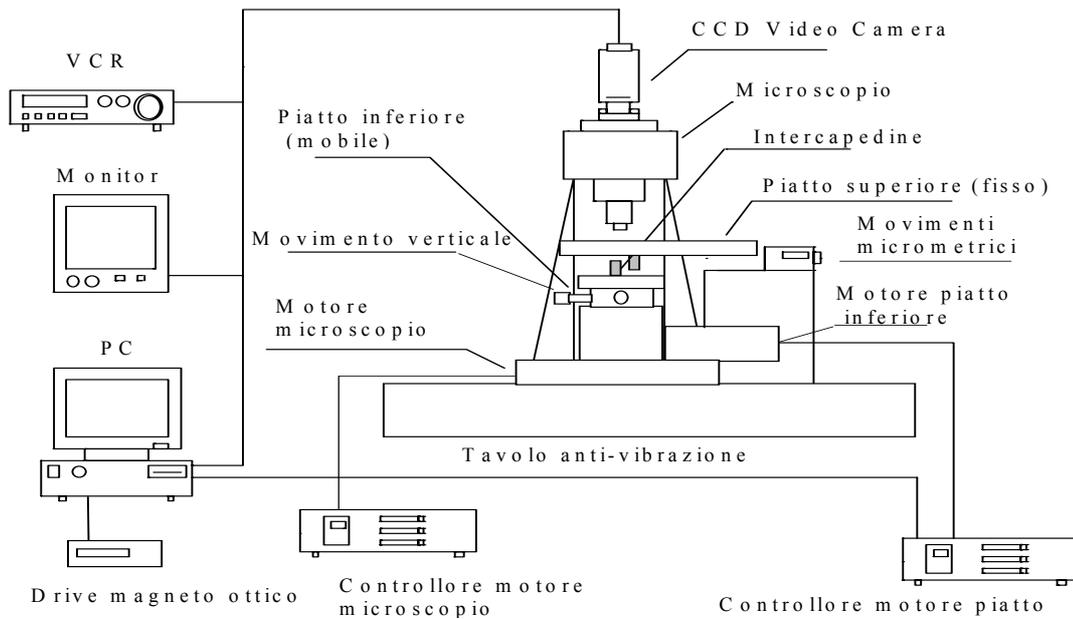


Figura 47: Apparato sperimentale completo.

2.6.3 Caricamento del materiale in caso di flusso di shear semplice

L'introduzione della fase dispersa nella matrice si realizza con un capillare di vetro, di diametro esterno pari a circa 400 μm , montato su due micro-manipolatori a vite che consentono il movimento su due assi perpendicolari al piano orizzontale.

Si riporta la procedura di preparazione del capillare:

- ✓ Scelta di un capillare dritto e privo di difetti.
- ✓ Caricamento del capillare con il fluido della fase dispersa evitando la formazione di bolle
- ✓ Realizzazione di un vetrino contenente la fase continua da porre sotto ad un microscopio ottico.
- ✓ Inserimento del capillare all'interno del vetrino tramite i micro-manipolatori a vite.
- ✓ Con l'ausilio dell'aria compressa, si fa spurgare il capillare controllando che non siano presenti impurezze e che la fuoriuscita del fluido sia frontale.

Una volta preparato il capillare, lo si trasferisce a fianco ai piatti paralleli. Dopo aver controllato che l'ampiezza dei movimenti consentiti dai micro-manipolatori sia adeguata, si procede all'allineamento del capillare.

La procedura di allineamento del capillare alla barretta fissa e a sé stesso si rende necessaria per consentire la generazione della goccia all'interno della matrice, in un gap di 900-1000 μ m, in posizione centrale, rispetto ai tre assi, con adeguata precisione. Infatti, nonostante una corsa di circa 5cm all'interno di un gap così stretto, il contatto del capillare con le pareti è da evitare per non avere adesione del capillare alle barrette, con il rischio di compromettere il caricamento e di rompere il capillare stesso.

Una volta allineato il capillare, è possibile versare la matrice esterna sulla barretta mobile e stringere il gap fino a 900-1000 μ m. Ora, si spinge il capillare fino all'interno dell'intercapedine nella posizione

ottimale, seguendolo con il microscopio. E' stata definita una procedura per la generazione di una goccia. Il materiale che la formerà è introdotto con l'ausilio d'aria compressa (Figura , 1 e 2), mentre è stato disposto il microscopio con la telecamera in modo tale da riuscire ad avere un controllo in tempo reale dell'operazione che si dovrà eseguire. Con opportuni movimenti del capillare si è generato un filamento (Figura , 3 e 4) che tende a rompersi per instabilità di Rayleigh (Figura , 5). Quando tale filamento è sul punto di rompersi, si utilizza una pompa a vuoto per risucchiare, all'interno del capillare di vetro, il materiale in eccesso in modo d'avere, infine, una singola goccia (Figura , 6). E' stato, così, possibile generare gocce singole, idonee sia dal punto di vista della pulizia del campione intorno a loro, sia dal punto di vista del controllo della posizione.

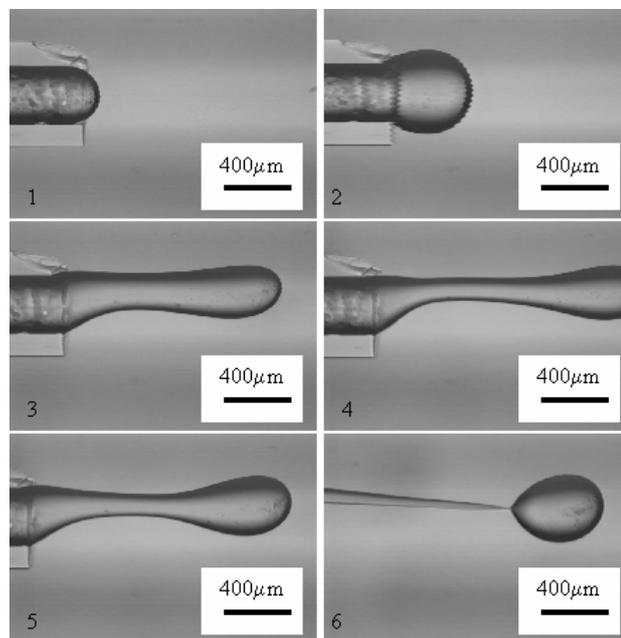


Figura 48: Caricamento della goccia nel caso di shear semplice.

La goccia da utilizzare nell'esperimento deve essere posizionata quanto più possibile al centro della distanza tra i piatti per evitare che,

nel momento in cui si stringe il gap, la goccia sia trascinata, insieme al fluido della matrice, troppo vicino ai piatti, risentendo dell'assenza della fase continua o, addirittura, uscendo dal gap tra le due barrette.

2.6.4 Generazione del flusso di shear semplice

Una volta generata la goccia e scelta la combinazione di lenti che permette di avere l'ingrandimento ottimale, si procede alla generazione del flusso di scorrimento. Il motore del ripiano portaoggetti, su cui è fissato il piatto, è pilotato tramite la porta seriale del computer per mezzo di una macro sviluppata in *Image pro Plus 4.5*, che invia i segnali al controllore del motore. In tale macro si definiscono le velocità e lo spostamento totale da compiere. Tali dati sono inviati, via porta seriale, al controllore e quindi al motore. Al termine della corsa si attende un tempo sufficiente per consentire il rilassamento della goccia fino a raggiungere l'originaria forma sferica. Per non superare la corsa finita del microscopio e del motore si alternano i versi delle corse dei piatti.

Sebbene uno degli scopi di questo lavoro di tesi sia studiare, in sostanza, l'effetto parete, durante gli esperimenti è stato necessario effettuare anche corse a basse velocità di scorrimento e a distanze fra i piatti grandi rispetto al raggio iniziale della goccia (fino a 20 volte), in quanto, come si spiegherà meglio nel capitolo seguente, il calcolo della tensione interfacciale, relativa alla coppia di fluidi utilizzata, presuppone la conoscenza dei parametri caratteristici della deformazione in condizioni di piccole deformazioni. La velocità del piatto inferiore è stata calcolata ogni volta, in modo da ottenere il numero di capillare desiderato, al variare della corsa delle barrette

durante l'esperimento, dell'esperimento stesso e quindi delle dimensioni delle gocce, e della distanza fra i piatti. Per valutare in maniera quanto più precisa possibile il punto critico di rottura, giunti nelle condizioni di flusso che realizzassero alti stati di deformazione della goccia, la velocità del piatto è stata aumentata lentamente incrementandola di 5-10 $\mu\text{m/s}$ per ciascuna corsa. Giunti alle condizioni prossime a quelle di rottura si è cercato di individuare il più alto numero di capillare al quale la goccia non si rompeva (Capillare critico inferiore) e il più basso al quale ciò accadeva (Capillare critico superiore). All'inizio d'ogni flusso di scorrimento si avvia la registrazione sia digitale sia analogica, che consentirà di ottenere il filmato della goccia in flusso e di eseguire l'analisi delle immagini.

2.6.5 Generazione del flusso in microcapillari

Per la generazione del flusso in microcapillari, non occorrono più entrambi i piatti paralleli, ma solamente quello inferiore, fisso, che fa da supporto otticamente compatibile. Sullo stesso vengono posti tre capillari a T. I capillari sono di fused silica rivestita da uno strato di poliammide e sono prodotti da Polymicro Technologies Inc. Tre capillari, aventi tutti diametro esterno pari a 436 ed interno pari a 319, vengono disposti in questo modo: i primi due sono posti sul piatto parallelo coassialmente, molto vicini tra loro. Il terzo è posto più in basso, perpendicolarmente ai primi due, ma anch'esso molto vicino, in corrispondenza centrale della zona che separa i due capillari maggiori (Figura 50). Nel capillare maggiore di destra viene iniettata la matrice tramite pompa a siringa *11 plus* della Harvard Apparatus, in quello

minore perpendicolare viene iniettata la fase dispersa e quindi creata la goccia.

La pompa a siringa Harvard 11 plus prevede un range di portata che va da 0.0014 $\mu\text{l/hr}$ a 26.56 ml/min, con un'accuratezza di $\pm 0.5\%$. Nel nostro caso il flusso era generato da portate comprese nel range 0.1 ml/hr a 1 ml/hr. Una schematizzazione dell'intero apparato è riportato nella seguente Figura 49.

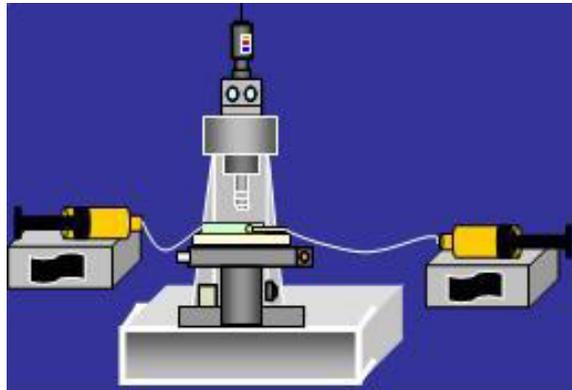


Figura 49. Schematizzazione delle apparecchiature richieste per il caricamento della goccia in microcapillare

La goccia, quindi, appena staccatasi dal capillare inferiore per instabilità di Rayleigh, risente del flusso proveniente dal capillare di destra, viene da tale flusso trascinato e per capillarità entra nel secondo capillare maggiore, posto a sinistra. Nell'entrare in tale capillare, la goccia tende poi a disporsi lungo l'asse dello stesso, secondo le modalità e le tempistiche descritte nel capitolo Risultati.

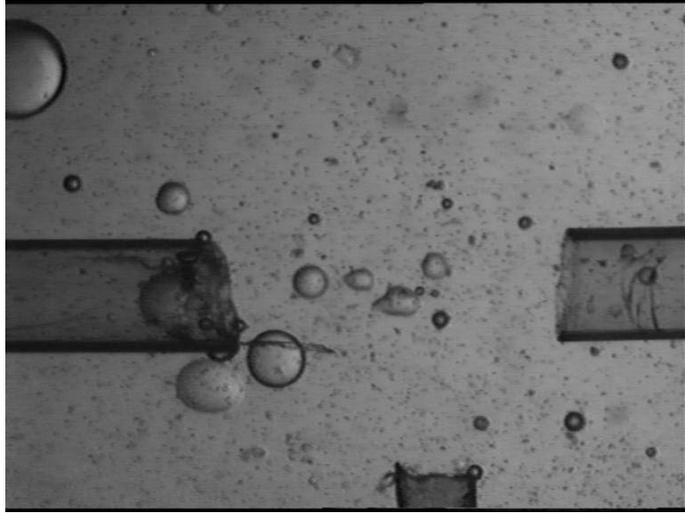


Figura 50. Ingresso della goccia in microcapillare

Riusciti a far entrare la goccia nel capillare di sinistra, si regola la portata desiderata mantenendola costante durante l'intera corsa, generando così il flusso di interesse. Nel corso dell'esperienza si analizzano diverse portate, ovvero diversi numeri di Capillare.

All'inizio d'ogni flusso di scorrimento si avvia la registrazione sia digitale sia analogica, che consentirà di ottenere il filmato della goccia in flusso e di eseguire l'analisi delle immagini. Va notato che il diametro della goccia generata, non può essere regolato a priori, ed inoltre la goccia non si trova mai in condizioni di quiescenza in una zona non confinata. Di conseguenza non è possibile misurare dalle immagini acquisite il raggio della goccia allo stazionario. Per ricavare tale fondamentale dimensione, si considera di star visionando la goccia sottoposta a flusso, e quindi deformata, lungo il piano diametrale, mostrando cioè la sua massima dimensione. Approssimando la goccia ad un solido di rivoluzione, si è sviluppato un programmino in Matlab che ne calcolasse il volume. Ipotizzando che in condizioni stazionarie

non confinate, la goccia assumesse forma sferica, attraverso la conservazione del volume se ne è calcolato il raggio.

2.6.6 Acquisizione ed analisi delle immagini (Apparato sperimentale 2)

L'analisi digitale delle immagini consente di misurare i parametri relativi alla deformazione della goccia in flusso di scorrimento sia in modalità "Live", durante lo svolgimento dell'esperimento, sia, in un secondo momento, sulle immagini a disposizione in formato digitale acquisite in tempo reale, sia sulle immagini digitalizzate in tempi successivi all'esperimento da videocassetta. Di seguito si descrivono l'hardware ed il software utilizzati durante il lavoro di tesi.

Il segnale analogico proveniente dalla telecamera o dal video registratore è digitalizzato tramite la scheda d'acquisizione (frame grabber), prodotta dalla Imegraph. L'immagine digitale, prodotta dalla scheda, è costituita da una matrice di 768x512 interi (pixel), di valore compreso tra 0 e 255, che indicano i livelli di grigio di ciascun punto dello schermo. La gestione del frame grabber è effettuata con il software *Image Pro Plus 4.5*, che, oltre a consentirne un controllo interattivo, è corredato da una biblioteca di routine standard per l'analisi delle immagini in linguaggio C. Il procedimento di analisi della sequenza filmata si può suddividere nel modo seguente:

- ✓ Acquisizione di singole immagini.

- ✓ Valutazione delle grandezze geometriche fondamentali.
- ✓ Valutazione dei parametri caratteristici della deformazione.

Le immagini sono acquisite, compresse, memorizzate ed analizzate in sequenza (quest'ultima fase non è sempre possibile in modalità 'live'), grazie ad una macro (*Single Drop Auto Live*), che, inoltre, permette di ricavare l'intervallo di tempo tra un'immagine e la successiva. L'intervallo di tempo minimo, con cui sono state acquisite le immagini con questa procedura, è stata di circa 1 secondo. La macro permette anche, in fase di acquisizione, di effettuare un'immediata misura delle grandezze geometriche fondamentali e dei parametri caratteristici della deformazione e ne fornisce l'andamento temporale.

Il presente lavoro di tesi ha utilizzato delle macro precedentemente sviluppate, per il movimento dei motori. Data, però, la vicinanza delle pareti alla goccia, quasi sempre, compaiono le immagini riflesse sulle superfici interne delle barrette. Il programma di acquisizione delle immagini distingue il contorno degli oggetti mediante un algoritmo che si basa sull'analisi dei livelli di grigio, ma, evidentemente, non è in grado di riconoscere un'immagine reale dal suo riflesso (il contorno della goccia è più scuro rispetto alla matrice per la differenza degli indici di rifrazione dei due fluidi).

Nel momento in cui la distanza fra le pareti è stata portata a valori uguali o minori del diametro della goccia, le difficoltà sono aumentate: la tonalità di grigio del bordo della goccia, non solo era la stessa dell'immagine riflessa, ma era assente il distacco visivo, almeno durante le fasi d'avvio del flusso e di rilassamento della goccia.

Per tali motivi si è resa necessaria l'implementazione di una macro in grado di:

- ✓ Consentire un riconoscimento dell'oggetto da seguire.
- ✓ Adattare la propria area d'interesse attorno all'oggetto.
- ✓ Consentire una regolazione dei parametri durante l'analisi.
- ✓ Analizzare e memorizzare un dato numero di immagini al secondo, in base alla durata della singola corsa delle barrette.
- ✓ Centrare, eventualmente, le immagini nel campo di vista per non osservare, ad esempio, movimenti relativi in un'eventuale sequenza costruita con quelle immagini.

L'analisi delle immagini acquisite consiste nella determinazione, e delle grandezze geometriche della goccia deformata, e della sua posizione; alcune di queste grandezze sono:

- ✓ Major axis e D , quando si può assumere che la forma della goccia sia in buona approssimazione ellissoidale [S.Guido e M. Villone,1998].
- ✓ Major diameter, quando la goccia non ha la forma ellissoidale.
- ✓ Angle

Tali grandezze costituiranno quel bagaglio di dati sperimentali che costituisce uno degli scopi di questa tesi.

3. RISULTATI

3.1 ANALISI IN VITRO

3.1.1 Analisi di globuli rossi in condizioni statiche

Ogni esperimento, durante questo lavoro di tesi, è stato preceduto da un'analisi morfologica della soluzione di globuli rossi in condizioni statiche, allo scopo di accertarne il buono stato di conservazione. Per poter portare avanti un tale tipo di analisi, è stato necessario avere a disposizione immagini ad alto ingrandimento: per questo scopo si è usato uno obiettivo ad immersione, in quanto fra la sua lente e il vetrino si deve interporre una goccia di un olio, con potere di ingrandimento di 100x. Utilizzando l'olio tra l'obiettivo e il vetrino si eliminano tutti i riflessi nel percorso dall'oggetto all'obiettivo. Senza questo accorgimento i riflessi causerebbero continue perdite di luce nel vetrino di copertura o sulla lente frontale dell'obiettivo: il potere di risoluzione verrebbe ridotto da questi riflessi.

Il vetrino con il quale viene a contatto l'olio e sul quale viene posto il campione di globuli rossi da analizzare ha uno spessore di 170 μm ed è usato appositamente per questo tipo di operazioni, che richiedono appunto di visualizzare dettagli molto molto fini. L'olio utilizzato è prodotto dalla ZEISS ed ha un indice di rifrazione (a 23°C) di $n=1,518$, esattamente armonizzato con l'indice di rifrazione del vetro. L'immagine microscopica viene fortemente pregiudicata se

nell'olio di immersione sono contenute bollicine d'aria. Per evitare questo inconveniente, l'olio deve essere applicato nel modo giusto. Fatto questo, basta avere un poco di attenzione nell'avvicinarsi con l'obiettivo al vetrino senza urtarlo, per evitare di danneggiarlo.

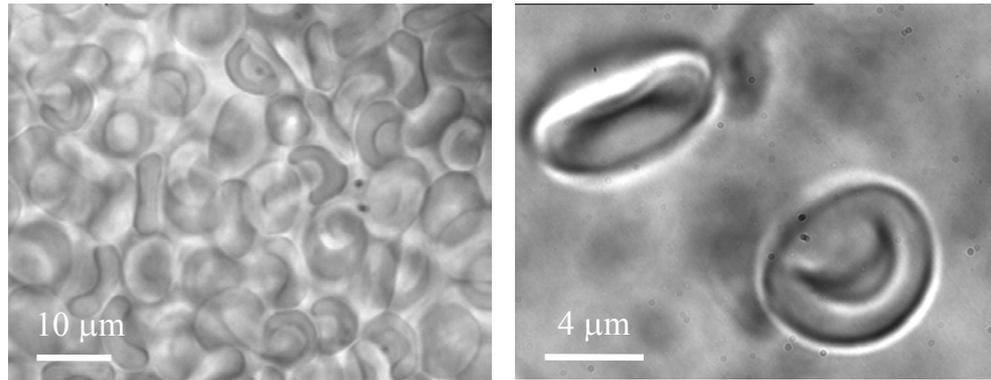


Figura 51: Globuli rossi sani ad alto ingrandimento

La Figura 51 mostra due immagini di globuli rossi ad alto ingrandimento, prima di essere sottoposti al flusso attraverso i microcapillari. Nell'immagine di sinistra si possono osservare globuli rossi concentrati: l'ottica usata è 100x1x1x, mentre in quella di destra i globuli rossi sono stati diluiti con soluzione fisiologica e l'ottica usata è 100x2x1x.

Le Figure 52 e 53 rappresentano immagini ad alto ingrandimento acquisite in condizioni statiche di globuli rossi patologici, rispettivamente macrociti e microciti.

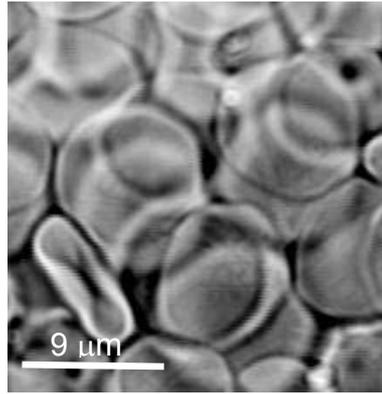


Figura 52: Macroцитi, ottica 100x1x1x

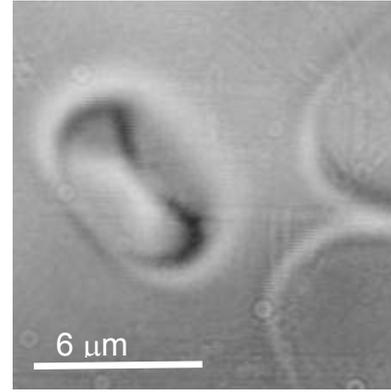


Figura 53: Microцитi, ottica 100x2x1x

La Figura 54 rappresenta un'immagine ad alto in gradimento di sferociti.

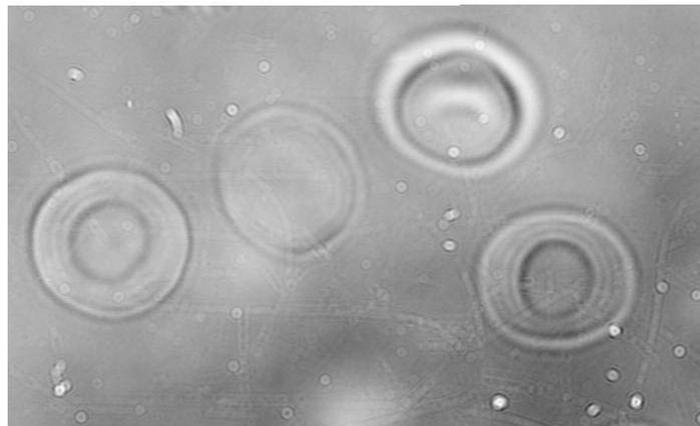


Figura 54: Sferociti, ottica 100x2x1x

3.1.2 Flusso di globuli rossi in capillari di agar di 50 μm

Quanto è stato osservato negli esperimenti svolti in questo lavoro di tesi con capillari di diametro di 50 μm -diametro che corrisponde a quello di arteriole (portano il sangue ai capillari) e venule (richiamano il sangue dai capillari) nell'apparato circolatorio del corpo umano- è in pieno accordo con quello che accade *in vivo*.

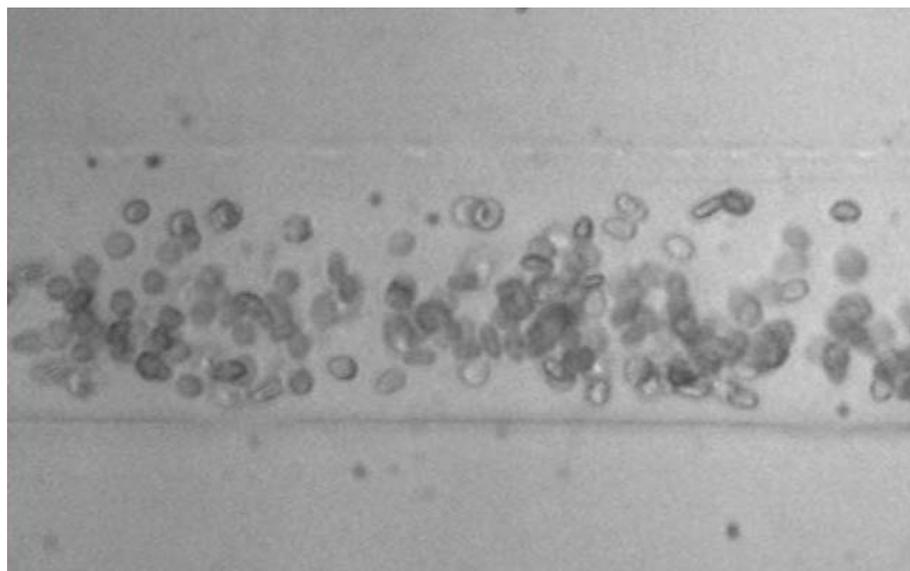


Figura 55: Eritrociti in flusso in capillare di 50 μm

In Figura 55 si può osservare la maggiore concentrazione dei globuli rossi intorno all'asse del capillare, di cui si è parlato precedentemente. Lo strato povero di globuli vicino alla parete del canale è stato osservato *in vivo* in arteriole e venule: la sua larghezza, che varia leggermente con il diametro del canale (Bishop et al., 2001; Tateishi et al., 1994), è solitamente di pochi micron e dipende dalla velocità del flusso sanguigno, dall'ematocrito e dal grado di aggregazione dei globuli rossi.

In Figura 56 si può osservare una sequenza di immagini acquisite durante un esperimento con globuli rossi in flusso in un capillare di gel di agarosio di diametro di $50\ \mu\text{m}$. Anche in questo caso, il risultato raggiunto in questo lavoro è in pieno accordo con i dati di letteratura, cioè il singolo globulo rosso ruota come un disco rigido intorno ad un suo diametro, mantenendo la sua forma di disco biconcavo.

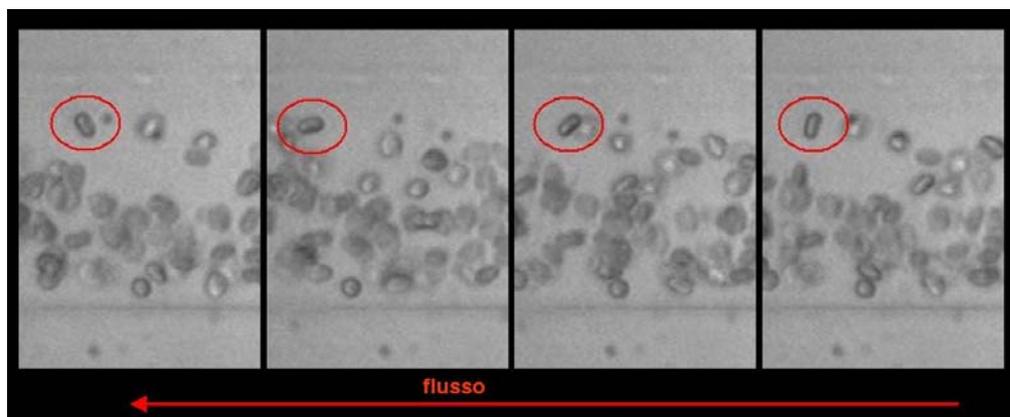


Figura 56: Dinamica di un globulo rosso in flusso in un capillare di $50\ \mu\text{m}$

3.1.3 Flusso di eritrociti sani in capillari di agar di $5\ \mu\text{m}$

È noto in letteratura che gli eritrociti cambiano la loro forma in quella a paracadute nelle arteriole precapillari, la mantengono attraverso i vasi capillari e tornano nella loro forma originaria nelle venule postcapillari. I diametri medi dei vasi capillari e degli eritrociti sono di 5 e $8\ \mu\text{m}$, rispettivamente. Di conseguenza, gli eritrociti che in condizioni statiche sono di forma biconcava devono cambiare sostanzialmente la loro forma quando si muovono attraverso i capillari (Skalak e Branemark, 1969). I globuli rossi subiscono questa

trasformazione nel passaggio attraverso i capillari per far sì che ci sia un'alta efficienza di diffusione dell'ossigeno ai tessuti aumentando l'area di contatto con le cellule endoteliali. La deformabilità dell'eritrocita si riferisce alla capacità dell'eritrocita di subire un cambiamento nella forma in risposta ad una forza deformante; è funzione della geometria della cellula e delle proprietà reologiche del liquido intracellulare e della membrana dell'eritrocita (Chien, 1987).

Come si è detto precedentemente, poiché il diametro del capillare è più piccolo rispetto a quello di un globulo rosso indeformato, l'eritrocita si deforma nella tipica forma a *paracadute*, simmetrica rispetto all'asse, durante il flusso nei vasi capillari. Il flusso cellulare in vasi capillari può essere misurato in termini di velocità del singolo globulo rosso, di numero di globuli rossi per l'unità di tempo (cambiamento continuo di RBC), o di tempo di transito attraverso la rete di capillari. Il cambiamento continuo di RBC è fisiologicamente importante come indicatore del trasporto di ossigeno (Popel e Johnson, 2005).

In questo lavoro di tesi sono stati condotti esperimenti che comportavano il flusso di globuli rossi attraverso un capillare di 5 μm , e si è riscontrato, in accordo con i dati di letteratura, che il singolo globulo rosso che attraversa un capillare di diametro minore della sua dimensione massima (8 μm) si deforma nella caratteristica forma a *paracadute*. In Figura 57 si mostra un globulo rosso sano in flusso all'interno di un capillare di diametro di 5 μm , sottoposto ad una pressione variabile tra 30 e 40 cm di acqua ad una velocità di circa 300 $\mu\text{m/s}$.

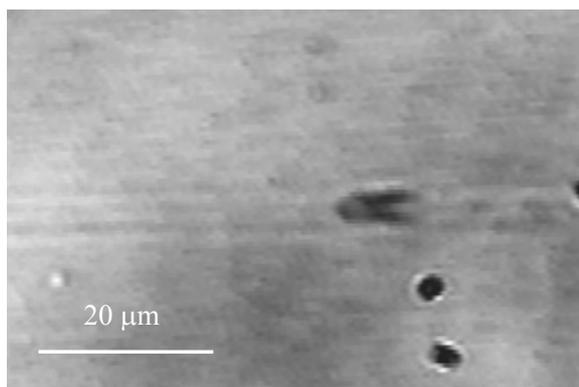


Figura 57: Globulo rosso in flusso in un capillare di 5 μm

In Figura 58 si mostra un'analisi del contorno del globulo effettuata applicando all'immagine di Figura 57 un threshold di livelli di grigio. Si può notare che la lunghezza massima del globulo è circa 4 volte maggiore dello spessore dello stesso in flusso.

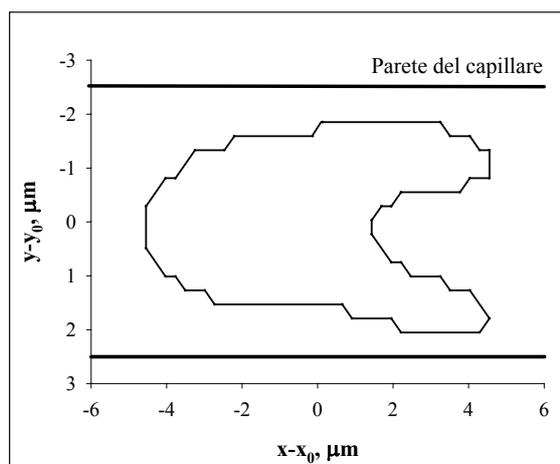


Figura 58: Analisi del contorno di un globulo rosso in flusso

Osservazioni *in vivo* ed *in vitro* hanno mostrato che quando viaggiano lungo vasi capillari il cui il diametro è paragonabile, o più piccolo, del diametro massimo delle cellule, le cellule si organizzano in una singola fila. Nel corso del movimento sotto l'influenza del flusso dovuto alla differenza di pressione, la membrana ruota

lentamente intorno all'interno delle cellule con un movimento di *tank-treading* (Pozrikidis, 2005).

La Figura 59 è un'immagine acquisita durante un esperimento con globuli rossi sani, e conferma la tendenza dei globuli rossi di impilarsi in un'unica fila quando fluiscono in un capillare di dimensioni paragonabili, o inferiori, a quelle di un eritrocita indeformato.



Figura 59: Impilamento di globuli rossi in un capillare di 5 μm

3.2 Flusso di globuli rossi patologici in capillari di agar di 5 μm

In questo lavoro è stato analizzato il comportamento in flusso in capillari di 5 μm di macrociti, microciti e sferociti. Per quanto riguarda il comportamento in flusso di macrociti e microciti, non sono state notate differenze visibili ad occhio nudo tra questi globuli “malati” e i globuli rossi sani, nel senso che gli eritrociti patologici riescono facilmente a passare nel capillare di 5 μm . In seguito ad un'analisi più dettagliata, però, si è notato che i macrociti, passando nel capillare di 5 μm ed essendo il loro diametro leggermente maggiore di quello di un eritrocita sano, e cioè di circa 8,5-9 μm , assumono la caratteristica forma a paracadute, come si può notare in Figura 60.

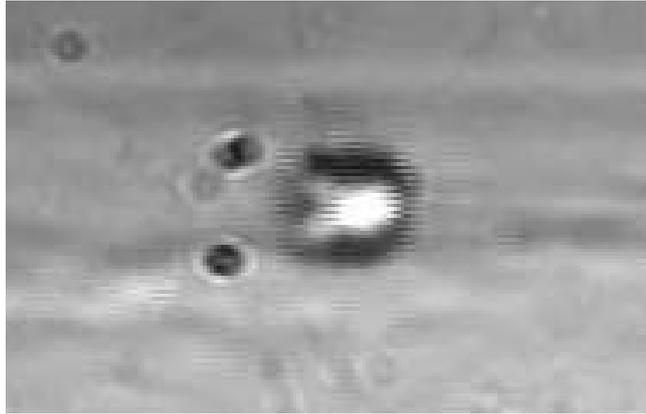


Figura 60: Macrocita in flusso in capillare di 5 μm

Per quanto riguarda il flusso dei microciti, invece, non è stata riscontrata la tipica deformazione del globulo nella forma a paracadute: un'interpretazione di questo fatto potrebbe essere che il globulo rosso microcitemico, avendo un diametro, in condizioni statiche, di circa 6 μm , e quindi minore di quello di un globulo rosso sano, riesce a passare nel capillare di 5 μm , ma senza deformarsi, con conseguente diminuzione del rapporto superficie/volume e, quindi, probabilmente, diminuzione anche dello scambio di ossigeno con i tessuti. La forma assunta dal microcita in flusso nel capillare di 5 μm è riportata in Figura 61. In prima analisi appare come una goccia di forma ellissoidale, con diametro maggiore di circa 9 μm .



Figura 61: Microcita in flusso in capillare di 5 μm

Gli sferociti, invece, hanno presentato un comportamento diverso, nel senso che non sono riusciti ad entrare nel capillare di 5 μm di diametro. In Figura 62 si può osservare uno sferocita che si avvicina all'imbocco del capillare ma non riesce ad entrare; per una possibile interpretazione di questo comportamento si potrebbe far riferimento alla minore deformabilità degli sferociti rispetto ai globuli rossi sani.

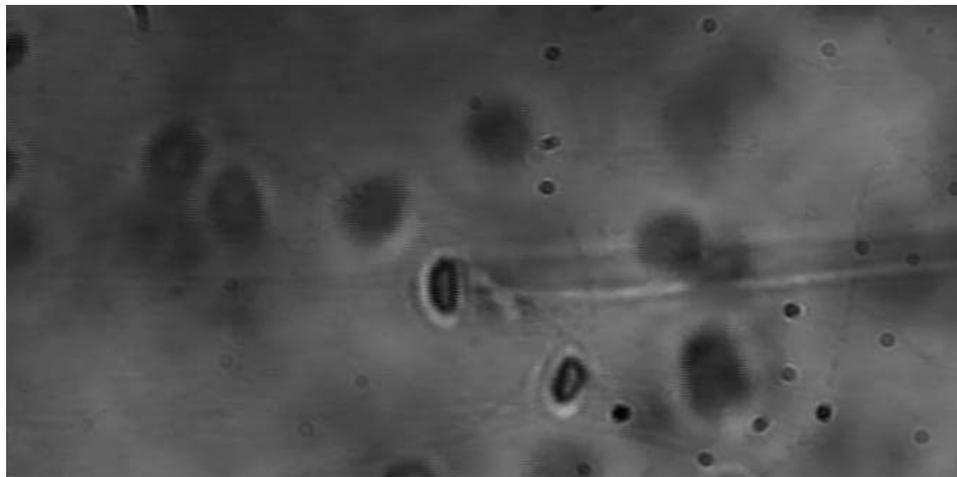


Figura 62: Sferocita all'imbocco del capillare di 5 μm

3.3 Velocità di globuli rossi in capillari di silica

L'analisi delle immagini in flusso in capillari di silica è stata effettuata su campioni di sangue sani e patologici. I risultati ottenuti hanno evidenziato le diverse velocità relative ai globuli rossi affetti da talassemia α e β e da sferocitosi rispetto a quelli sani.

Il primo grafico (Fig. 63) si riferisce a campioni sani ma valutati a tre diverse lunghezze dei microcapillari: in ognuno di essi si nota una proporzionalità diretta tra la velocità e il Δp come ci ricorda la legge di Poiseuille ($Q = \frac{\pi \Delta p R^4}{8 \eta L}$), che opportunamente semplificata mediante

l'espressione della portata ($Q = vR^2\pi$), fornisce $v = \frac{\Delta p R^2}{8\mu L}$ (a)

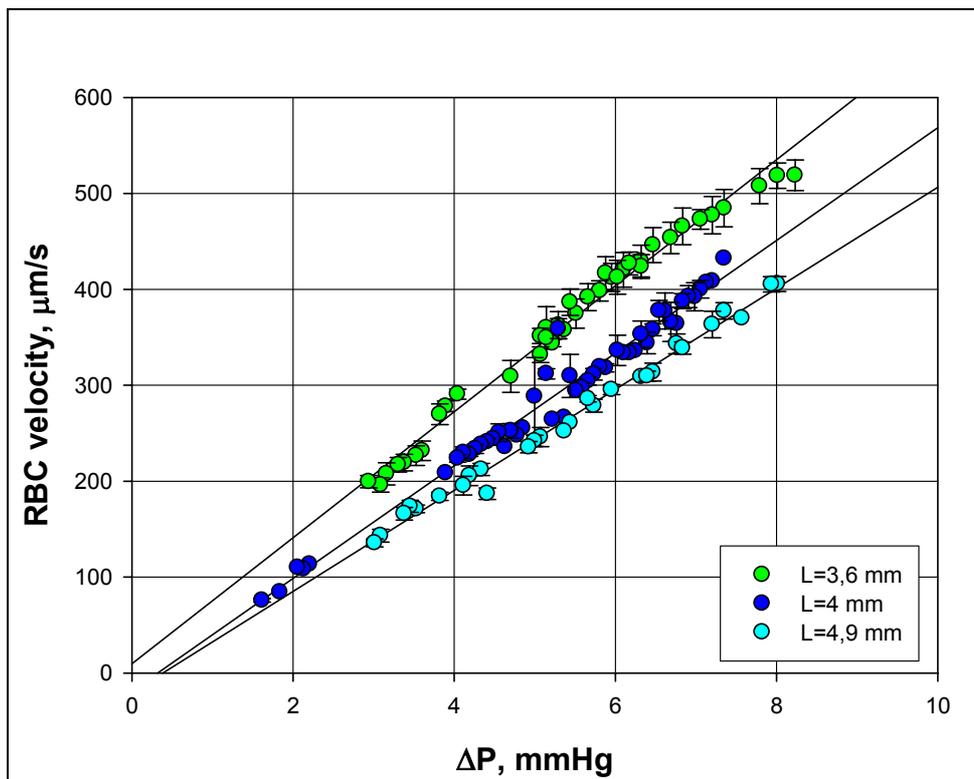


Figura 63: Confronto della velocità nel caso di capillari di differente lunghezza

Si osservi dal grafico che a parità di Δp le velocità dei globuli rossi sono diverse; in particolare quelli che fluiscono nel capillare più lungo incontrano una maggiore resistenza risultando quindi più lenti, come si poteva prevedere dalla (a).

Al contrario i globuli che passano nel capillare più corto presentano velocità maggiore incontrando meno difficoltà nel fluire.

Ciò che è interessante ulteriormente verificare è se i risultati sono indipendenti dalla lunghezza del capillare, assicurando la riproducibilità dell'esperimento. Se si scalano i risultati ottenuti prendendo come riferimento un'unica lunghezza si osserva che i risultati dei tre campioni sono sovrapponibili, cioè si ottiene un'unica "master curve" della velocità dei globuli sani vs il battente; ciò sta a significare che l'esperimento è riproducibile per diversi campioni e il flusso nei microcapillari non dipende dal donatore, ma può essere preso come termine di confronto con i casi patologici.

Quindi, stante le proprietà del fluido sano e la proporzionalità inversa tra la lunghezza del capillare e la velocità del sangue, evidenziata nella (a), se i capillari da 4 e 4,9 mm fossero riferiti ad un'unica lunghezza (3,6 μm in questo caso) si avrebbero profili di velocità sovrapponibili (Fig. 64).

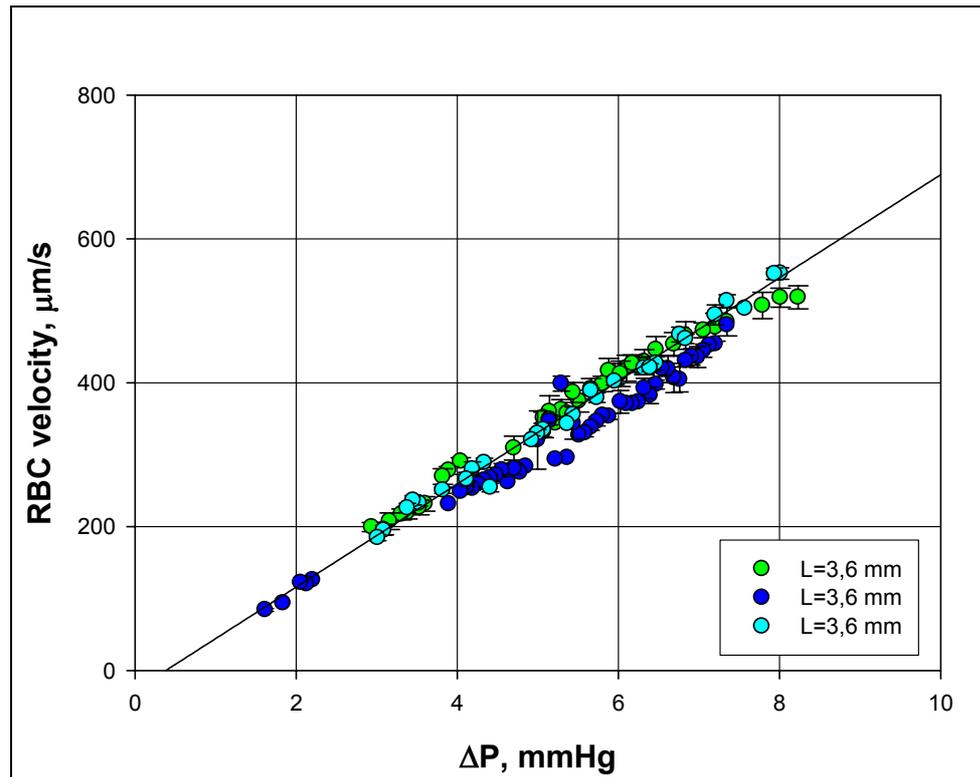


Figura 64: Confronto della velocità nel caso di capillari di uguale lunghezza.

Ciascun punto in Figura 64 rappresenta il valore medio della velocità dei globuli rossi ottenuto da numerose sperimentazioni a parità di battente. A questo punto si vuole dimostrare che valgono le stesse considerazioni riferendosi a diametri differenti, in particolare di 5 e 6,6 μm . I campioni esaminati sono sani.

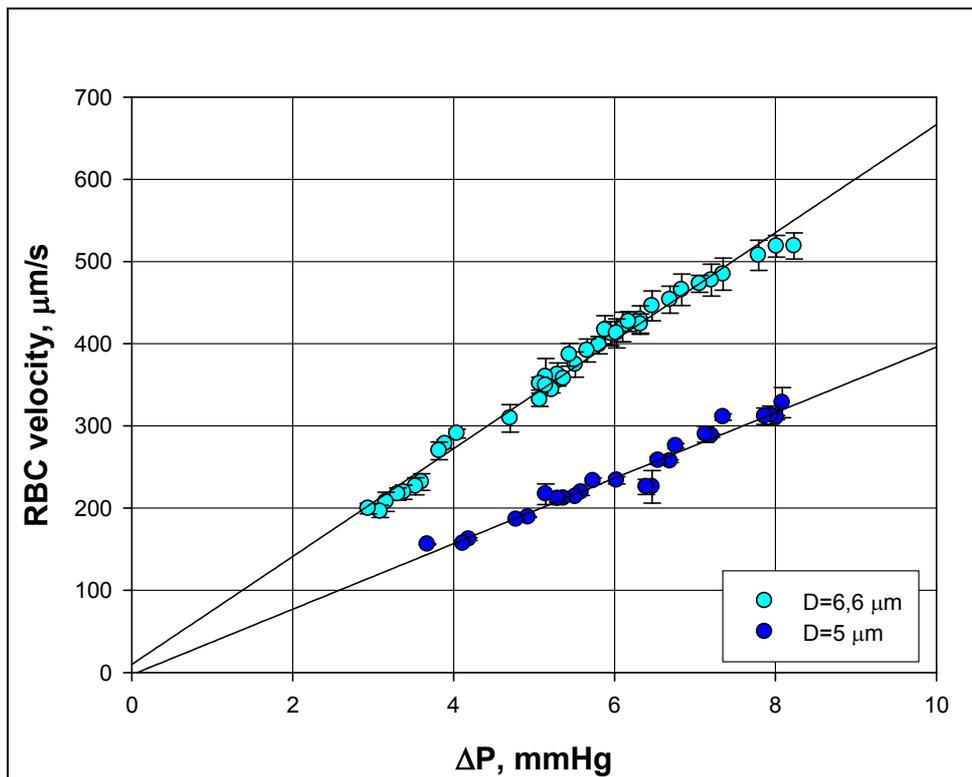


Figura 65: Confronto della velocità nel caso di due capillari di diverso diametro.

Anche qui si nota che a parità di Δp sussiste la proporzionalità diretta tra velocità e diametro anticipata dalla (a): in particolare i globuli che fluiscono nel capillare di $5 \mu\text{m}$ presentano una velocità minore di quelli che passano nel capillare di $6,6 \mu\text{m}$.

Se si scalano i risultati ottenuti, cioè se i capillari vengono riferiti rispetto ad un unico diametro pari a $6,6 \mu\text{m}$ e si sovrappongono questi grafici, fissate le proprietà del fluido sano, si hanno due profili di velocità sovrapponibili (Figura 66).

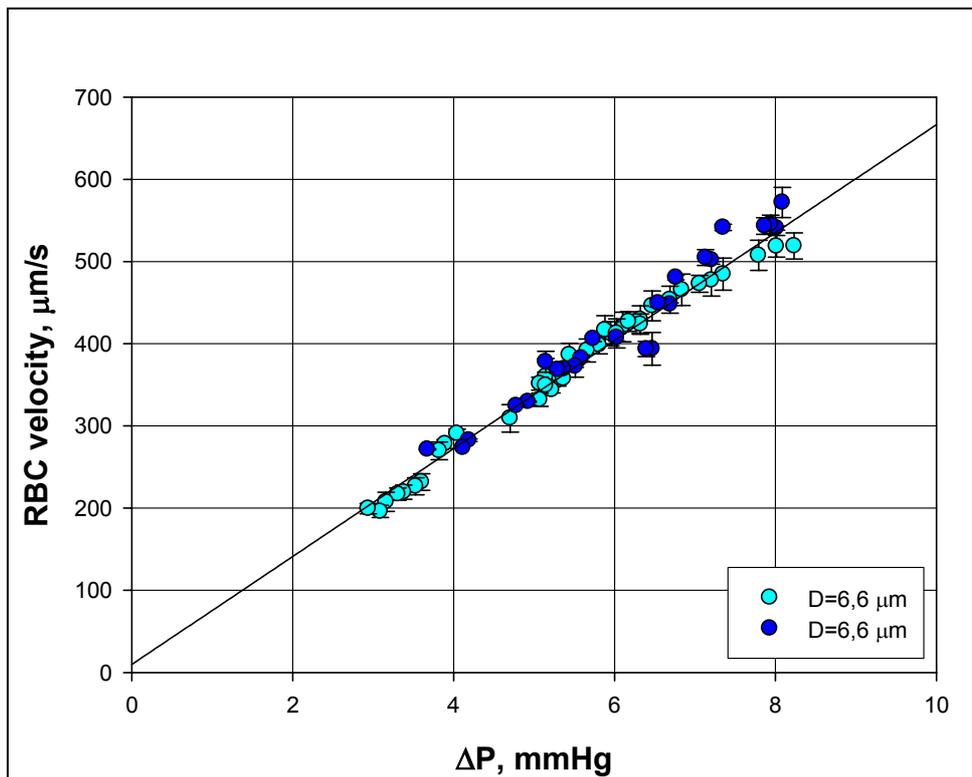


Figura 66: Confronto della velocità nel caso di capillari di uguale diametro.

Anche in tal caso si può affermare che l'esperimento è riproducibile. Si considerano, a questo punto, in un unico grafico i campioni sani analizzati, in cui si può osservare l'evidente differenza di velocità per differenti diametri (Fig. 67). Dal confronto si evince che, per i globuli in flusso in capillari di $6,6 \mu\text{m}$, si hanno valori delle velocità perfettamente sovrapponibili tra di loro e questo assicura la perfetta riproducibilità dell'esperimento qualora venissero utilizzati diversi campioni di sangue.

Inoltre, nel caso di globuli in flusso in capillari di $5,0 \mu\text{m}$ si hanno valori delle velocità inferiori rispetto a quelli ricavati in capillari di diametro di $6,6 \mu\text{m}$ vista la maggiore difficoltà che incontrano i globuli in un capillare di dimensioni minori.

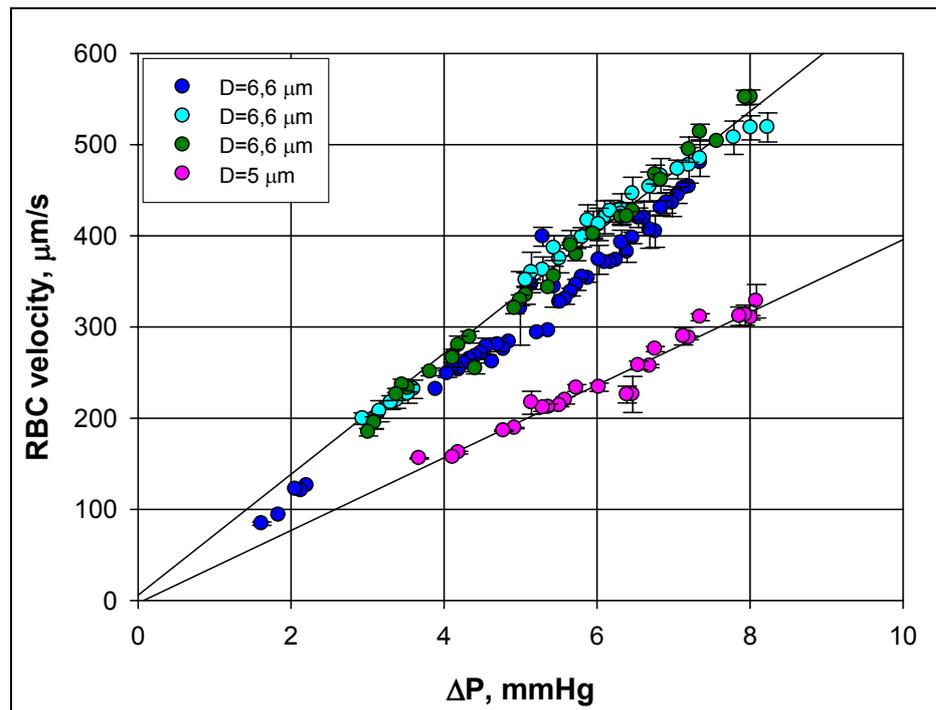


Figura 67: Confronto della velocità per differenti diametri.

Si osservi che tutti i punti si trovano approssimativamente lungo una linea, che tende a zero per battente nullo. Ciò dimostra che il battente misurato è fondamentalmente in relazione con la caduta di pressione tra i capi del microcapillare e quindi le altre perdite di pressione (dei tubi di alimentazione e di uscita e la caduta di pressione dovuta al flusso convergente verso il capillare) sono trascurabili.

Per verificare la relazione tra dati sperimentali e teorici è stato costruito un grafico che indica proprio i valori di velocità misurati in relazione alla velocità teorica media, espressa dalla legge di Poiseuille, e a quella massima (Fig. 68). La linea rossa mostrata in Figura 68 rappresenta il valore della velocità media del fluido lungo il capillare secondo la (a), dove Δp è il battente, R ed L sono il raggio e la lunghezza del capillare e μ è la viscosità del liquido in sospensione,

misurata con un viscosimetro di vetro. Si ricordi che l'equazione di Poiseuille è basata sull'ipotesi di flusso parabolico ben sviluppato di un fluido newtoniano in un tubo a sezione circolare; quindi il fatto che i valori sperimentali della velocità si trovino su una retta rappresentativa di valori teorici ci mostra l'importanza del risultato.

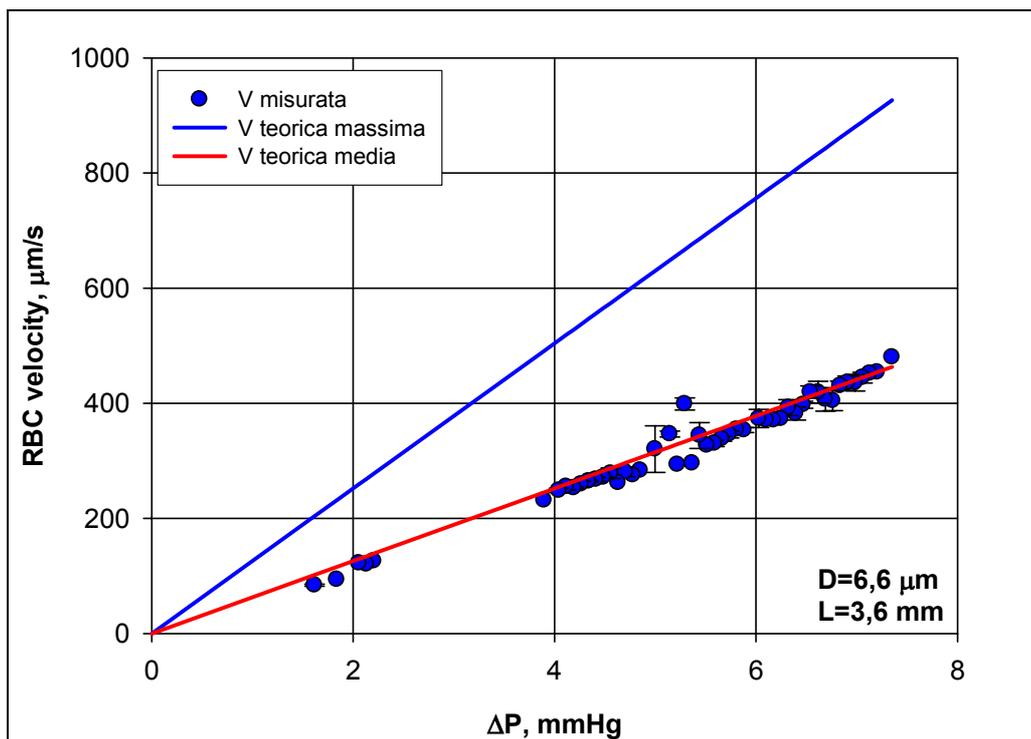


Figura 68: Confronto della velocità nel caso di sangue sano.

Ciò che si ottiene è che la velocità media e quella misurata sono sovrapponibili, come già è stato osservato e che, ovviamente, la velocità massima è maggiore delle altre.

3.4 FLUSSO ERITROCITARIO IN CAPILLARI DI SILICA DI $100 \mu\text{m}$

Gli stessi capillari di silica sono stati poi sfruttati per studiare il flusso sanguigno in vasi di dimensioni dell'ordine di 100 μm . Due sono i principali motivi di interesse per questo caso, la valutazione del profilo di velocità e l'analisi della fluidodinamica in prossimità delle pareti.

Gli esperimenti condotti hanno mostrato come il flusso in questo caso sia di tipo plug flow, con una parte di globuli nella zona centrale e distante dalle pareti, che tende a muoversi con all'incirca la stessa velocità.

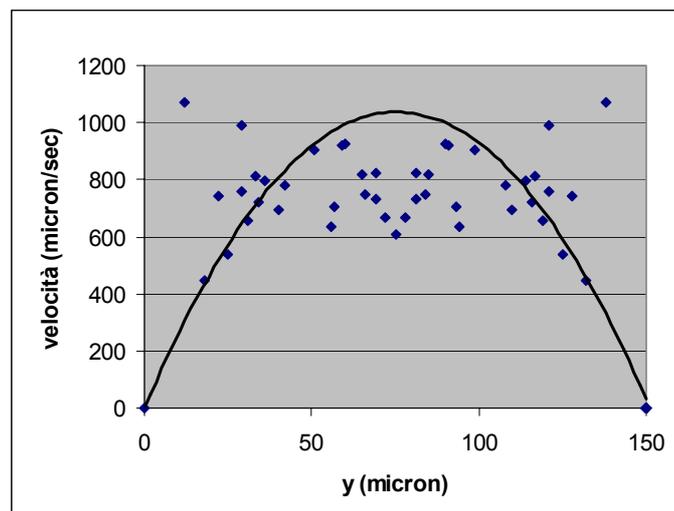


Figura 69. Profilo di velocità in funzione della posizione dei globuli nel piano di mezzeria di un capillare di 150 μm , con portata 0.005 ml/min

Nonostante la metodica di generazione del flusso sia la stessa che nel caso di capillari di dimensioni paragonabili a quelle eritrocitarie (caso cioè di singolo globulo), ben più difficile risulta in questo caso l'analisi delle immagini. Il problema maggiore è dato, oltre che da piccoli spostamenti del singolo globulo lungo l'asse di vista Z, proprio dalla interazione e dalla sovrapposizione tra i singoli globuli durante

tutto il flusso, ciò che ha reso difficile distinguerne il contorno nel tempo. L'analisi si è dovuta quindi condurre manualmente, frame per frame, globulo per globulo.

Uno studio di Gaetghens del 1986 supporta i risultati ottenuti e mostra inoltre come all'aumentare della portata imposta, il flusso da plug flow diventi parabolico (Figura 70).

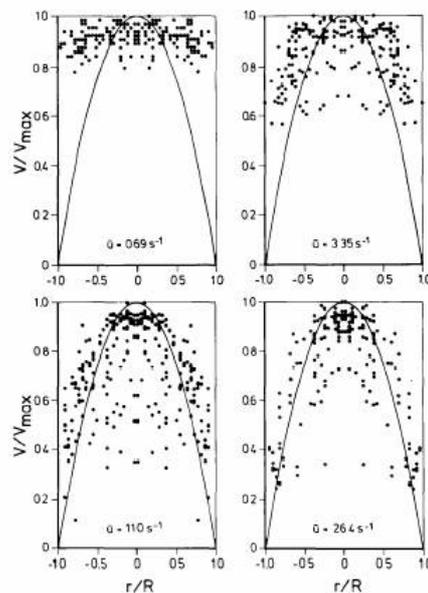


Figura 70: Profilo di velocità al variare della portata imposta, Gaetghens (1986)

Analizzando sia i nostri dati sperimentali che il lavoro sopraccitato, si riscontra come in prossimità delle pareti ci sia una zona sostanzialmente semipriva di globuli e che per basse portate, gli sporadici globuli che vi fluiscono abbiano talvolta velocità maggiore che nella zona centrale. L'interpretazione che ne dà Gaetghens è che ciò accade proprio perché essendo la zona vicino i bordi priva di

globuli, i pochi che vi passano, traslano senza essere disturbati da altri corpuscoli limitrofi, ciò che invece avviene nella zona centrale dove la fluidodinamica del singolo globulo, che oltre a traslare inizia anche a ruotare, è influenzata dagli altri globuli adiacenti.

3.5 ANALISI DEL SISTEMA MODELLO

La sezione che segue riguarda le analisi condotte sul sistema modello, inizialmente in flusso di shear semplice, poi in microcapillare. I primi due paragrafi saranno da considerare comuni per le due tipologie, si mostreranno prima le caratteristiche reologiche dei fluidi utilizzati in fase sperimentale, poi i risultati relativi al calcolo della tensione interfacciale ottenuti dallo studio delle cinetiche di rilassamento delle gocce per piccole deformazioni e confronto con la teoria di Rallison. Le metodologie usate sono ovviamente comuni per le due tipologie di esperimenti.

Da questo punto in poi si riporteranno i risultati, prima per gli esperimenti di flusso di shear semplice e dopo per esperimenti in microcapillare.

Per la prima tipologia si mostreranno i risultati ottenuti sul microconfinamento in flusso tra piatti paralleli di una singola goccia, cioè l'effetto parete. Tutti gli esperimenti di questo tipo sono stati condotti con vista vorticità, con rapporto di viscosità $\lambda=1$, mentre la distanza tra le pareti delle barrette, relativa alle dimensioni della goccia ($d/2a$), è stata progressivamente ridotta. Saranno riportate le seguenti analisi:

- Studio qualitativo delle cinetiche di rilassamento dalla condizione stazionaria di deformazione delle gocce, fissato Ca , al diminuire della distanza tra le pareti; confronto con i dati relativi ad un fluido Newtoniano immerso in una matrice viscoelastica con pareti all'infinito.
- Studio delle piccole deformazioni subite dalla goccia e confronto con le previsioni teoriche di Taylor, Chaffey-Brenner, Greco e Shapira-Haber.
- Studio delle alte deformazioni subite dalla goccia e confronto con le previsioni teoriche di Chaffey-Brenner, Greco e con i dati sul flusso elongazionale.
- Studio dell'influenza dell'effetto parete sulla forma della goccia e sulla sua stabilità in flusso e confronto con i risultati di Migler.
- Descrizione delle cinetiche di rottura della goccia e delle differenze con i casi di goccia Newtoniana in matrice Newtoniana e non Newtoniana con parete all'infinito.

Seguirà poi la parte relativa agli esperimenti in microcapillare. Questo tipo di esperimenti è stato eseguito nei casi di $\lambda = 1$ e $\lambda = 4$. Saranno riportate le seguenti analisi:

- Studio delle cinetiche di raggiungimento della condizione stazionaria di deformazione delle gocce, per diverse posizioni di partenza della goccia stessa.
- Studio qualitativo della morfologia di regime delle gocce in flusso, al variare del numero di Ca e delle dimensioni della goccia rispetto a

quelle del capillare.

- Studio quantitativo della morfologia e della velocità a regime delle gocce in flusso, al variare del numero di Ca e delle dimensioni della goccia rispetto a quelle del capillare.
- Studio delle linee di flusso intorno una goccia isolata e tra treni di gocce.
- Studio delle linee di flusso interne alle gocce al variare della dimensione della goccia rispetto a quella del capillare e confronto con le simulazioni numeriche disponibili in letteratura.
- Studio qualitativo del fenomeno di break-up a differenti valori di λ

3.5.1 Caratterizzazione reologica

I fluidi utilizzati sono Newtoniani ed esibiscono una viscosità costante al variare della velocità di scorrimento. Tutte le misure sono state effettuate a $T=23^{\circ}\text{C}$. Per ridurre gli errori sperimentali si è eseguita una media dei valori misurati di viscosità. A titolo di esempio si riporta la curva di viscosità dei fluidi utilizzati per il caso di shear semplice. Seppur con valori ovviamente diversi, il grafico è qualitativamente analogo a quello di tutti gli altri fluidi utilizzati. Per i valori di viscosità di ciascun fluido si rimanda alla già citata Tabella 3.

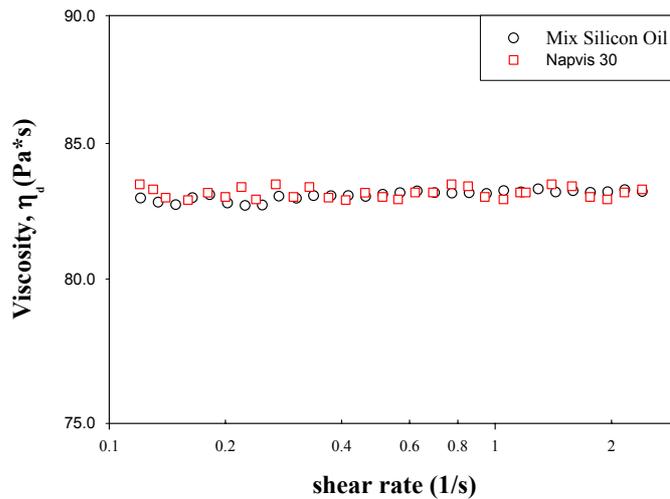


Figura 1: Diagramma della viscosità dei fluidi sperimentali vs la velocità di scorrimento a $T=23^{\circ}C$.

3.5.2 Calcolo tensione interfacciale

Un parametro chiave, che influenza la morfologia delle miscele e, in particolare, la loro dipendenza dalle condizioni di flusso, è la tensione interfacciale tra le due fasi. I parametri adimensionali da considerare per il calcolo della tensione interfacciale nel caso di fluidi Newtoniani sono il numero di Capillare Ca , il rapporto di viscosità e il parametro di deformazione D .

Si è verificato che il valore di tensione interfacciale ottenuto dalla teoria in transitorio di Rallison, valida per coppie di fluidi Newtoniani, si discosta leggermente da quello ricavato dalla teoria in stato stazionario del primo ordine di Taylor. Per questo motivo si è scelto di utilizzare quale valore di tensione interfacciale, quello ricavato dalla teoria di Taylor (Figura 2). Anche qui si riportano i dati relativi alla tipologia di esperimento di shear semplice, essendo stati ottenuti in maniera analoga quelli relativi al caso di flusso in microcapillare.

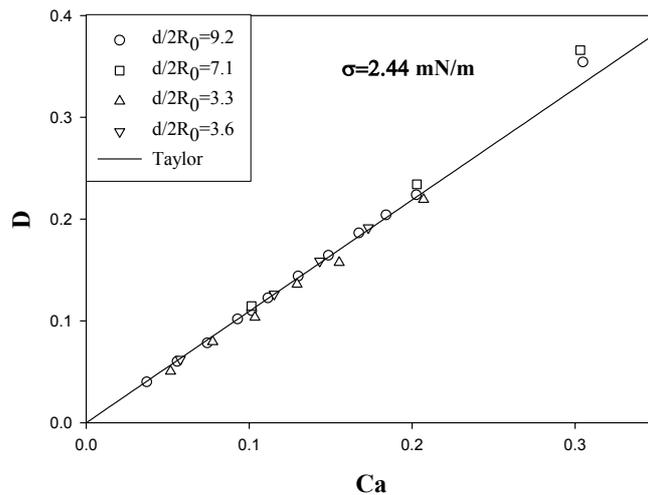


Figura 2: Parametro di deformazione D vs Ca , a diversi $d/2R_0$.

Dal grafico di figura 72 si ha una prima indicazione sull'effettivo gap che si deve raggiungere per avvertire l'effetto parete: fino a valori di $d/R_0=3.3$ non vi è differenza con i valori del parametro di deformazione con pareti all'infinito e, quindi, con la formulazione di Taylor.

In condizioni di flusso la singola goccia presenta una deformazione che è funzione della velocità di scorrimento. Bloccando il flusso, si osserva il rilassamento della goccia verso la forma sferica iniziale.

Solitamente si riporta il $\ln(D/D_{ss})$ in funzione del tempo t per ottenere la tensione interfacciale dalla pendenza della interpolazione lineare dei punti sperimentali, noti tutti gli altri parametri caratteristici del sistema (Figura 3). La misura è, in genere, effettuata analizzando il rilassamento di più gocce per una stessa coppia di fluidi ed effettuando una media aritmetica dei valori di tensione interfacciale ricavati da ogni analisi. Il valore così ottenuto di tensione interfacciale è usato per ottenere il grafico del $\ln(D/D_{ss})$ in funzione del tempo adimensionale

$t\sigma/\eta_c R_0$ (dato dal rapporto tra il tempo sperimentale t ed il tempo di emulsione $\eta_c R_0/\sigma$). Il tempo adimensionale depura il grafico dagli effetti dimensionali, in quanto, ad esempio, una goccia due volte più grande di un'altra rilassa, rispetto ad essa, due volte più lentamente. Dal grafico di Figura 3 si comprende che, nei due esperimenti a diversi $d/2R_0$, le gocce hanno diverse dimensioni. Utilizzando il tempo adimensionale i dati relativi ai vari rilassamenti saranno confrontabili.

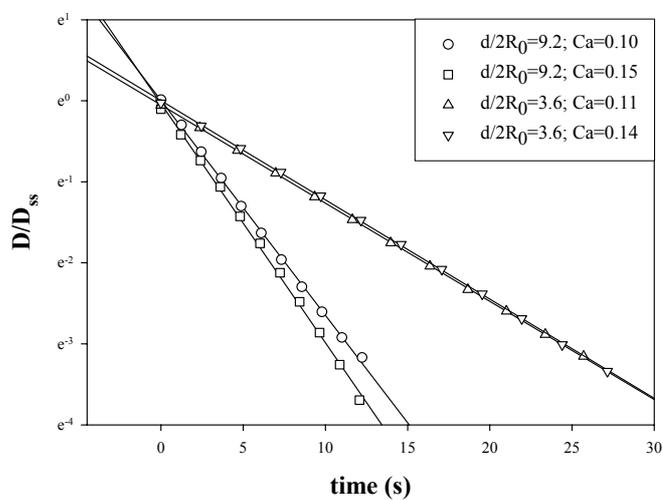


Figura 3: Rilassamento di due diverse gocce a due diversi $d/2R_0$.

Invece di seguire la procedura finora descritta per il calcolo della tensione interfacciale, si utilizza l'equazione 16 per confrontare le cinetiche di rilassamento con la formulazione di Rallison, ma con la tensione interfacciale calcolata tramite la teoria di Taylor (Figura 4).

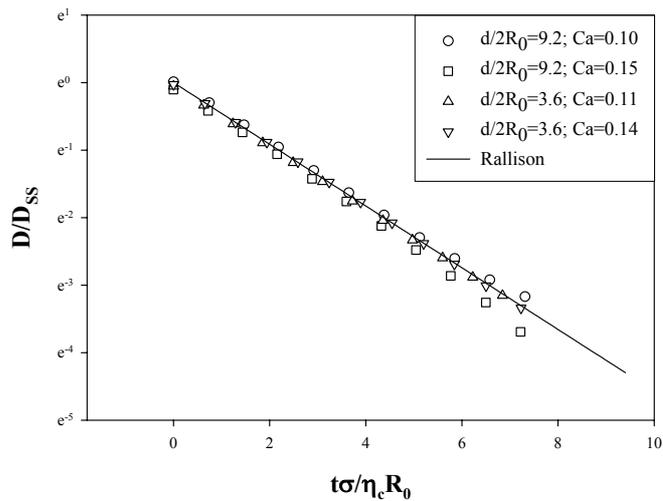


Figura 4: Rilassamento a due diversi $d/2R_0$, confronto con la formulazione di Rallison con $\sigma=2.44 \cdot 10^{-3} \text{ N/m}$ e $\lambda=1$.

Questo grafico evidenzia un buon accordo dei dati sperimentali con la formulazione di Rallison in cui la tensione interfacciale utilizzata, è quella calcolata dalla teoria in stato stazionario di Taylor, cioè:

$\sigma = 2.44 \cdot 10^{-3} \frac{N}{m}$ per i fluidi usati negli esperimenti di flusso di shear

semplice e $\sigma = 0.25 \cdot 10^{-3} \frac{N}{m}$ per i fluidi usati negli esperimenti in

microcapillari.

3.6 Tipologia 1: Flusso di shear semplice

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in flusso di scorrimento semplice, con vista vorticità, con rapporto di viscosità $\lambda=1$.

3.6.1 Analisi morfologica

Si riporta, innanzi tutto, una sequenza indicativa della deformazione di una goccia. Il parametro adimensionale $L/2R_0$, rapporto tra il diametro maggiore della goccia e il suo diametro iniziale, in genere, è stato preferito al parametro di deformazione D in quanto, anche per capillari relativamente bassi, l'effetto delle pareti ha indotto delle deformazioni considerevoli, facendo perdere alla goccia la forma ellissoidale. Sulle ordinate si è riportato il tempo adimensionalizzato $t\sigma/\eta_c R_0$, dato dal rapporto tra il tempo trascorso e il tempo d'emulsione (Figura 5).

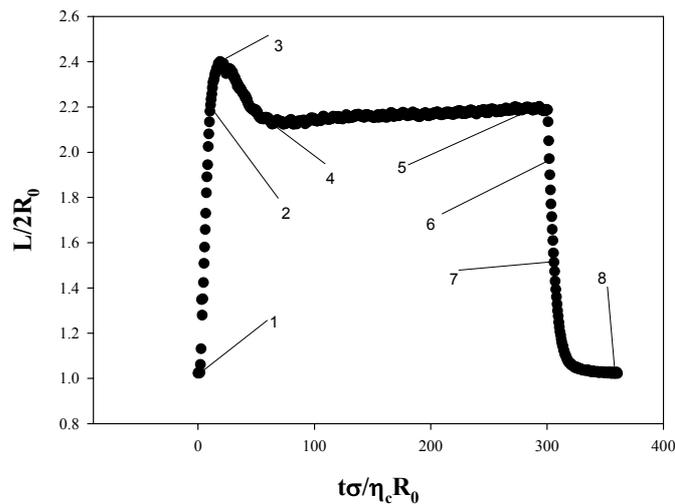


Figura 5: Deformazione di una goccia di raggio $R_0=172\mu\text{m}$ a $Ca=0.3$,

$$\dot{\gamma} = 0.05\text{s}^{-1}, \lambda=1.$$

La goccia è stata sottoposta ad una velocità di scorrimento di 0.05 s^{-1} , cui corrisponde un numero di Capillare di 0.3.

In Figura 6 sono riportate le immagini corrispondenti agli istanti salienti della sequenza di deformazione. In ciascuna di esse, oltre alla

scala, è riportato il valore del tempo adimensionale. La prima immagine si riferisce alla goccia in condizioni di quiescenza, la seconda al transitorio iniziale, la terza all'overshoot, in cui la goccia raggiunge la sua massima lunghezza, la quarta ad un undershoot appena pronunciato, in cui si osserva una piccola ritrazione, la quinta alle condizioni stazionarie, la sesta si riferisce alle fasi iniziali del rilassamento, la settima ad una fase successiva, sempre del rilassamento, ed infine l'ottava mostra la goccia nuovamente in condizioni di quiescenza.

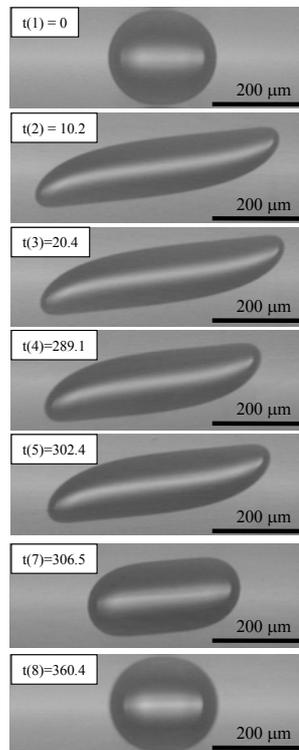


Figura 6: Sequenza di immagini della deformazione di una goccia di raggio

$R_0=172\mu\text{m}$ a $Ca=0.3$, $\dot{\gamma} = 0.05\text{s}^{-1}$, $\lambda=1$.

E' stata eseguita un'analisi digitale del contorno della goccia nelle fasi salienti della deformazione.

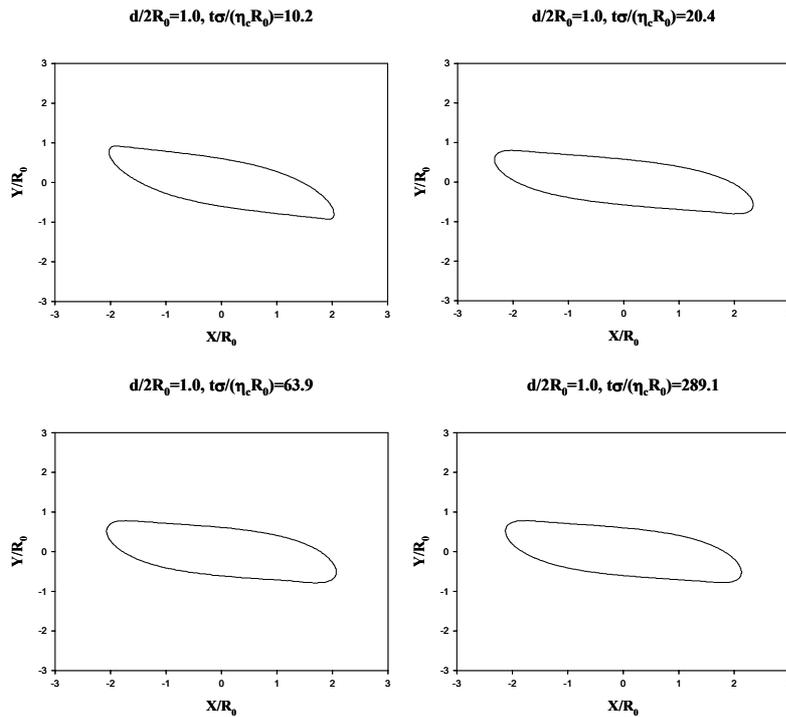


Figura 7: Analisi digitale del contorno di alcune immagini di Figura 6.

Da queste figure è possibile evidenziare la forma a sigmoide assunta dalla goccia durante il flusso e la presenza di estremità appuntite. Allo stato attuale non è disponibile una teoria che preveda tali forme.

3.6.2 Piccole deformazioni (bassi Ca)

In Figura 8 si riporta l'andamento del parametro di deformazione D in funzione del numero di Capillare, per diversi valori di $d/2R_0$. Il parametro di deformazione D ovviamente cresce al numero di capillare, ed aumenta man mano che si restringe il gap tra i piatti paralleli. Si noti l'ottimo accordo dei dati sperimentali con l'andamento previsto teoricamente da Taylor.

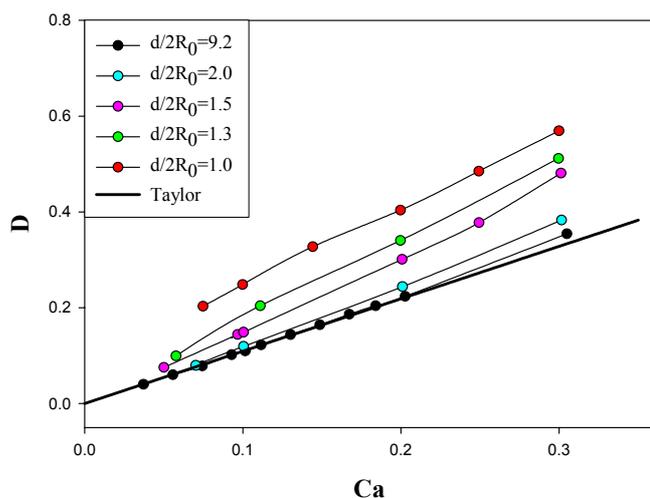


Figura 8: D in funzione del numero di Ca al variare di $d/2R_0$.

Analogamente e con medesime osservazioni, si riporta l'andamento del parametro $L/2R_0$ in funzione del numero di Capillare, per diversi valori di $d/2R_0$.

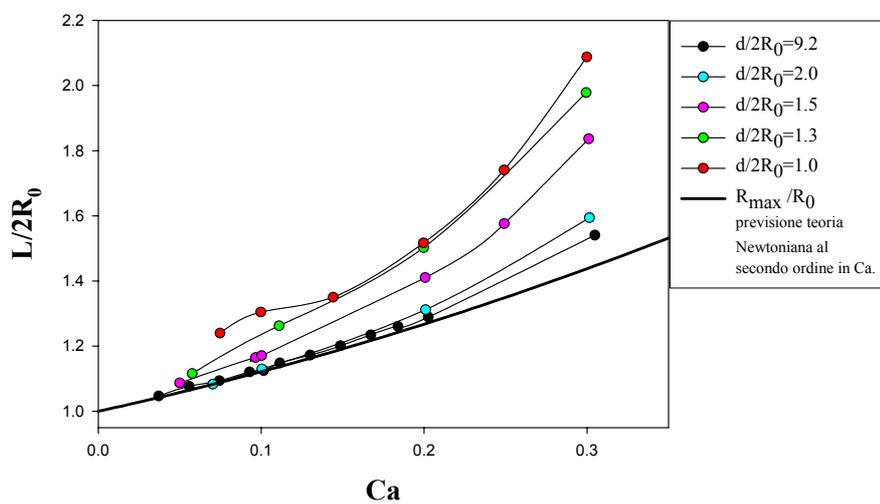


Figura 9. $L/2R_0$ Vs Ca

Di seguito si riporta l'andamento del parametro $L/2R_0$ in funzione del tempo adimensionalizzato, a numero di capillare fissato $Ca=0.1$ (Fig. 80 e 81) prima e $Ca=0.3$ poi (Fig. 82 e 83), per diversi valori del

parametro $d/2R_0$. Si nota come per valori di quest'ultimo da 7.2 a 2, l'andamento della deformazione della goccia sia identico, la goccia si deforma monotonamente fino a raggiungere lo stazionario, con le stesse tempistiche e lo stesso grado di deformazione. Scendendo con il gap, per valori di questo ad esempio pari una volta e mezzo il raggio della goccia indeformata, pur continuandosi ad avere un andamento monotono, la goccia si deforma più che in precedenza. Per un gap 1.3 volte la goccia poi, inizia a notarsi una differente evoluzione, con la presenza di un overshoot prima di raggiungere la condizione stazionaria. Al diminuire del gap l'entità di tale overshoot aumenta, e la goccia tende ad assumere una forma via via più sigmoidale con la presenza di punte alle estremità, come riportato dalla figura seguente che mostra la morfologia della goccia allo stazionario al diminuire del parametro $d/2R_0$. E' chiaro infine come il parametro $L/2R_0$ aumenti con Ca a parità di $d/2R_0$.

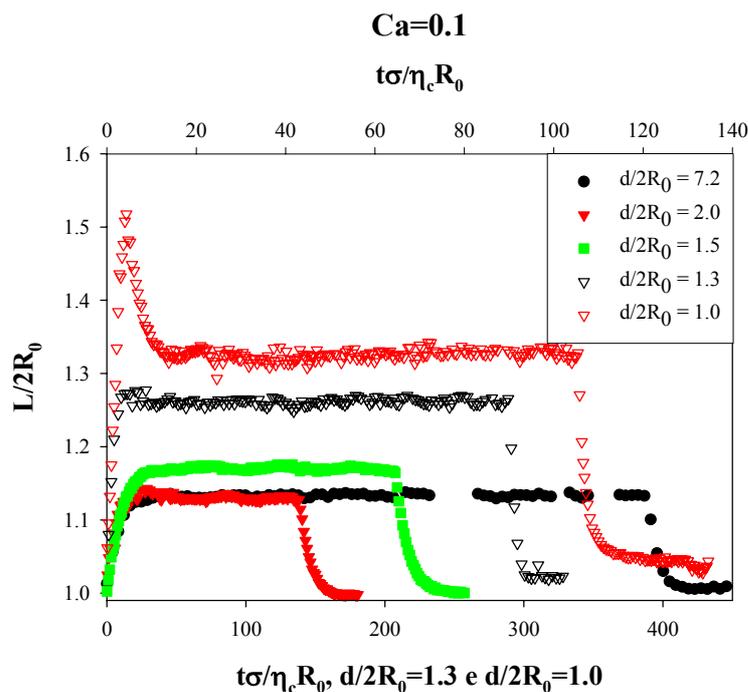


Figura 80. Transitori di deformazione a $Ca=0.1$

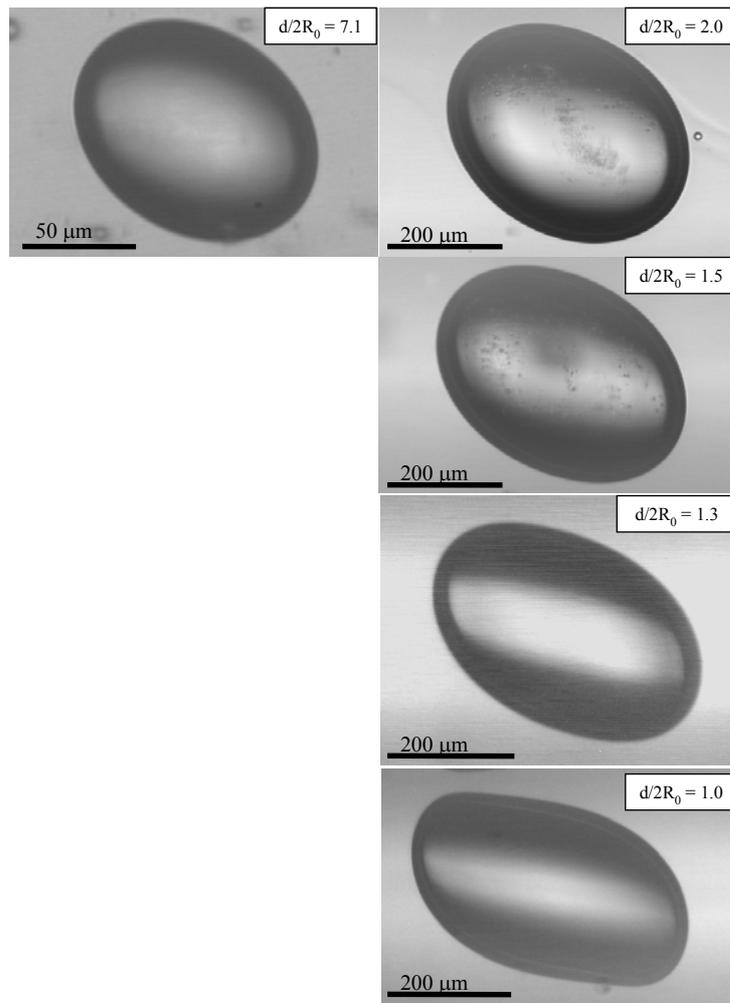


Figura 81. Morfologia di deformazione a $Ca=0.1$

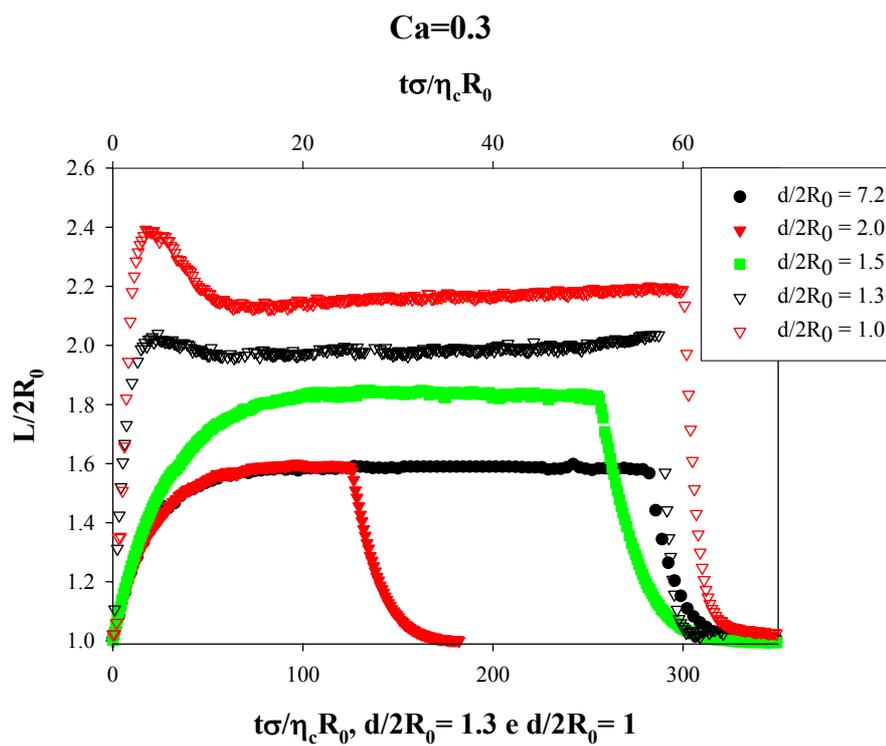


Figura 82. Transitori di deformazione a $Ca=0.3$

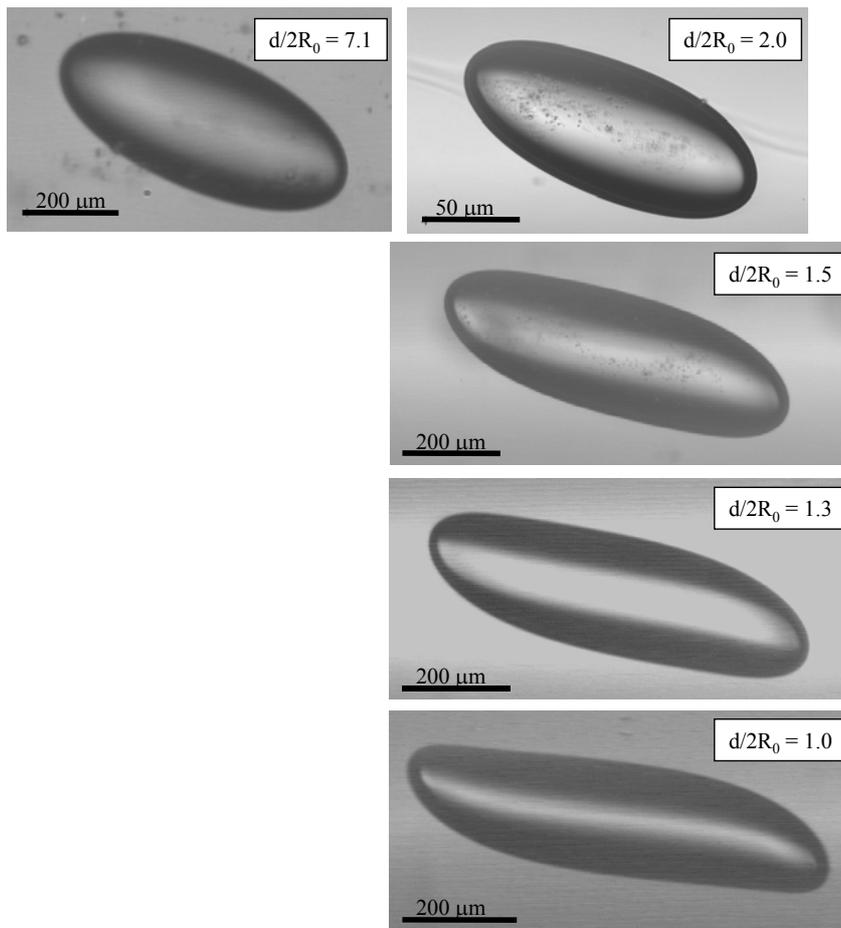


Figura 83. Morfologia di deformazione a $Ca=0.3$

3.6.3 Alte deformazioni (alti Ca)

Di seguito si riporta l'andamento di $L/2R_0$ lungo il tempo adimensionalizzato al variare del numero di Ca (per alti Ca ,da 0.35 a 0.48) nel caso di gap tra i piatti pari alla dimensione della goccia sottoposta a flusso di scorrimento. Per alti valori di Ca, da 0.4 in poi, si nota come l'evoluzione morfologica presenti una serie di due overshoot-undershoot, di entità decrescente che presumibilmente conducono ad uno stazionario che con i mezzi a disposizione però non

si è riuscito ad osservare, richiedendo questo tempi, e quindi spazio corsa, superiori a quelli sperimentali.

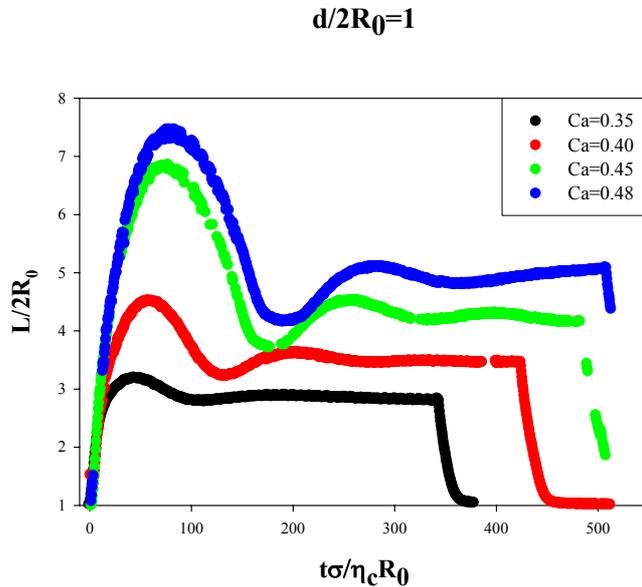


Figura 84. Transitori di deformazione a diversi Ca , da 0.35 a 0.48

3.6.4 EFFETTI SULLA STABILITA' IN FLUSSO

Si riporta ora un confronto tra il caso di flusso non confinato ed il caso in analisi in cui si risente di effetti pareti. Nella figura sottostante, la sequenza a sinistra mostra le tipiche forme assunte dalla goccia in un flusso non confinato ($d/2R_0 = 7$), quella a destra in presenza di effetto parete ($d/2R_0 = 1$), entrambi a $Ca=0.4$.

L'andamento di sinistra è il seguente: a partire da una configurazione sferica allo stazionario (1), la goccia diventa man mano più deformata ed orientata lungo la direzione del flusso (2)-(4) fino a raggiungere una condizione stazionaria (5). Alla cessazione del flusso la goccia rilassa tornando alla forma iniziale sferica (6).

Ben diversa è l'evoluzione morfologica in presenza di effetto parete. In questo caso, di nuovo si parte da una condizione sferica (1), lo stato stazionario (5) si raggiunge in modo non monotono in quanto sia la deformazione della goccia che l'orientazione di questa passano attraverso dei massimi (4) e dei minimi (5), con un andamento oscillatorio smorzato, come descritto in precedenza. Si noti inoltre, come descritto anche per bassi Ca, che nel caso confinato la goccia non assume una forma ellissoidale come nel caso non confinato, bensì sigmoidale con punte agli estremi. Come prima, una volta stoppato il flusso la goccia ritrae verso l'iniziale forma sferica, sebbene in questo caso assuma forme di ritrazione diverse (6).

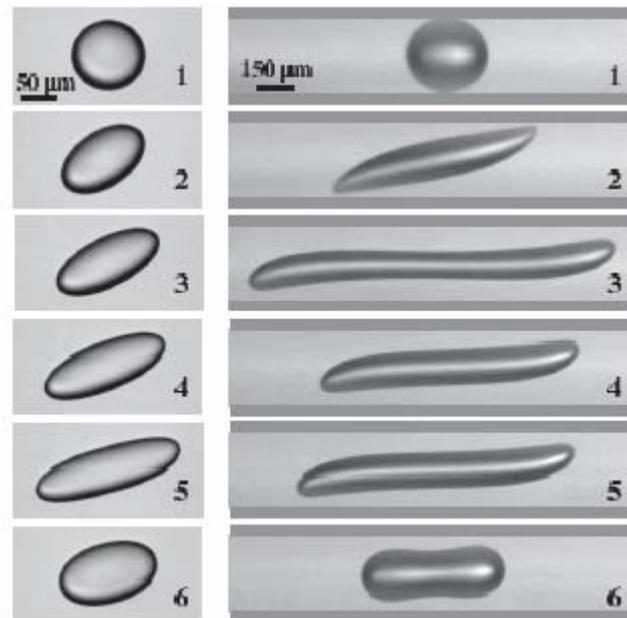


Figura 85. Confronto morfologico tra flusso non confinato (sx) e flusso confinato (dx)

Di seguito (Figura 86) si riporta un rappresentazione quantitativa di quanto sopra esposto, il grafico di $L/2R_0$ in funzione del tempo

adimensionalizzato sia nel caso di flusso confinato che in assenza di effetti pareti (grafico interno). Si noti come, in presenza di effetti pareti riguardo al caso di flusso non confinato, il valore stazionario del parametro in ordinata sia quasi 2 volte superiore, ed il tempo richiesto di un ordine di grandezza maggiore. Abbiamo visto infatti come al diminuire del gap il transitorio diventi via via più lungo al crescere di Ca , fino a che non è stato più possibile raggiungere lo stazionario con i mezzi sperimentali a disposizione, come detto in precedenza.

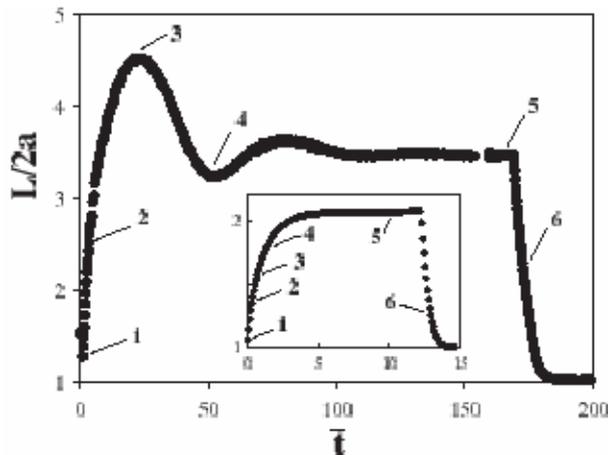


Figura 86. Confronto analitico tra flusso non confinato (interno) e flusso confinato (esterno)

Ricordiamo qui che, per piccole deformazioni, un'espressione analitica di tale andamento è stata derivata da Shapira-Haber, come su esposto. La risultante correzione al primo ordine per effetti parete mostra che la forma della goccia, così come calcolata da Taylor, è uguale al caso di flusso non confinato e che solo l'entità della deformazione aumenta. Riportiamo di seguito un confronto dei nostri dati sperimentali con la teoria di Shapira-Haber. Il grafico di figura 87

mostra l'andamento del parametro di deformazione D al variare del rapporto tra il raggio della goccia e la distanza tra i piatti tra i quali fluisce, per tre valori di Ca 0.1, 0.2 e 0.3. I punti rappresentano i risultati sperimentali, le linee la previsione teorica.

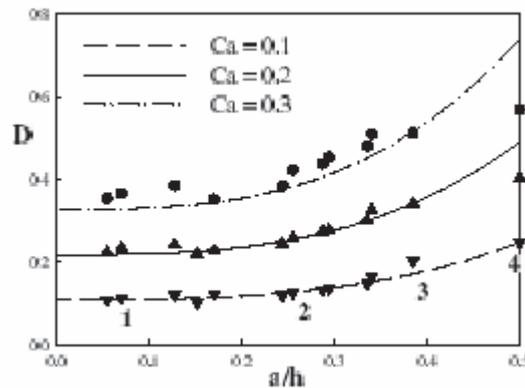


Figura 87. Confronto tra dati sperimentali e dati teorici

Come mostrato finora, la deformazione aumenta al numero di Ca ed all'avvicinamento tra i piatti. L'accordo tra i dati sperimentali e teorici si dimostra ottimo, specie per bassi valori di Ca , sui quali appunto la teoria come detto si basa. Concentrando l'attenzione al caso $Ca=0.1$, è interessante notare come anche per alti valori di a/h , dove la migrazione da forma ellissoidale a sigmoidale è palese, l'accordo con i dati teorici è ancora buono.

Si noti anche come l'accordo tra dati sperimentali e teorici sia decisamente buono anche per i due valori più alti di numero di Ca , tranne nel caso in cui la dimensione della goccia è pari alla distanza dei piatti, ove il metodo di riflessione di Lorentz appunto non vale più.

In definitiva, come conseguenza dell'aumentare della deformazione della goccia al diminuire del gap tra i piatti, forme

decisamente allungate, che sarebbe instabili nel caso di flusso non confinato, sono osservate come stazionarie in presenza di effetti parete. Inoltre, la goccia deformata è più orientata lungo la direzione del flusso che nel caso non confinato. Questi comportamenti sono ancora più enfatizzati nel caso in cui la dimensione della goccia sia maggiore di quella della distanza tra i piatti paralleli. Questo effetto di stabilizzazione può essere spiegato in termini di distorsione del campo di moto dovuto all'effetto parete, che infatti aumenta la rotazione del corpo rigido in flusso, con conseguenti linee di flusso praticamente chiuse entro cui la goccia è confinata a ruotare, a differenza del caso non confinato ove tali linee di flusso sono aperte.

3.6.5 CINETICHE DI BREAK-UP

Un'altra importante conseguenza dell'effetto parete riguarda il comportamento alla rottura, che abbiamo trovato avvenire a numeri di Ca e tempi più alti (circa il doppio) rispetto al caso non confinato. Nella figura 8 riportiamo la rottura avvenuta a $Ca=0.46$ (condizioni leggermente supercritiche) per $d/2R_0= 0.7$ (sequenza superiore) e $Ca=0.6$ per $d/2R_0= 0.5$.

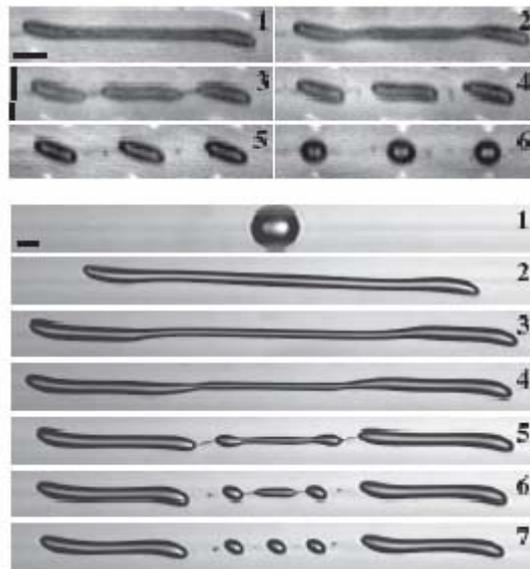


Figura 88. Cinetiche di rottura a $Ca=0.46$ per $d/2R_0= 0.7$ (sequenza superiore) e $Ca=0.6$ per $d/2R_0= 0.5$ (sequenza inferiore).

Nel primo caso la dinamica della rottura è caratterizzata da un notevole allungamento della goccia seguito da una rottura nei punti di assottigliamento lungo la stessa. La rottura risulta in 3 gocce figlie e due satelliti. E' interessante notare come le gocce figlie abbiano quasi le stesse dimensioni, a differenza del caso non confinato dove i frammenti centrali sono più piccoli di quelli laterali.

Nel secondo caso invece notiamo un restringimento dell'intera parte centrale che conduce ad una rottura della goccia stessa, ed una seconda rottura della parte centrale appunto, dando luogo a più frammenti che nel caso non confinato.

3.7 TIPOLOGIA 2: FLUSSO DI SCORRIMENTO IN MICROCAPILLARI

3.7.1 Start-up di deformazione

Iniziamo qui la descrizione dei fenomeni relativi al flusso di gocce in capillari di dimensioni paragonabili alle proprie. Cominciamo con il valutare la cinetica e la dinamica con le quali le gocce, una volta entrate nel capillare, raggiungono una condizione stazionaria durante il flusso. Come mostrato dalle immagini seguenti, nell'entrare nel capillare di flusso, la goccia subisce un allungamento.

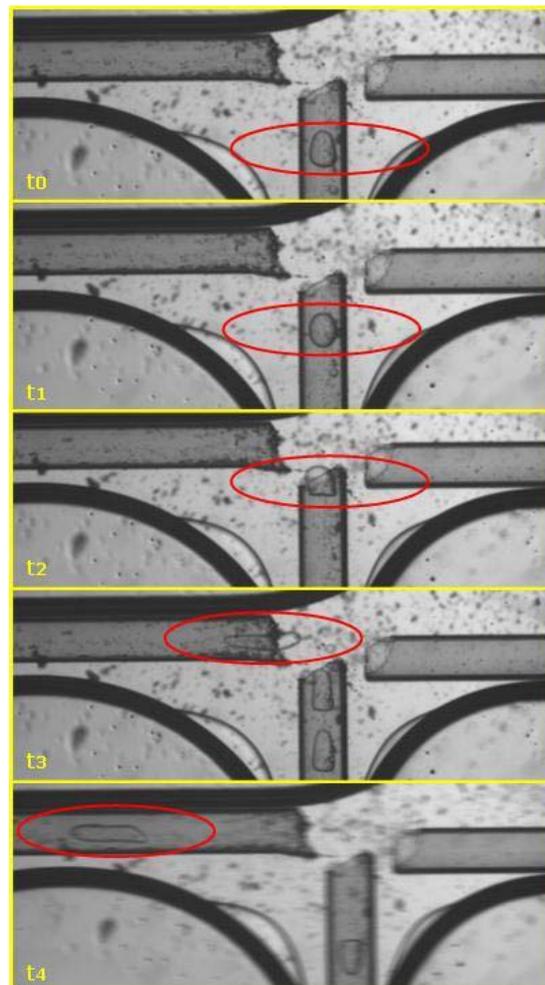


Figura 89. Allungamento della goccia dovuto all'ingresso nel capillare

Andando a valutare, per la goccia così entrata, l'andamento dell'asse maggiore rapportato al raggio della goccia in condizione indeformate in funzione del tempo adimensionalizzato Vt/D , dove V è la velocità media di bulk, t il tempo sperimentale e D il diametro del capillare. Possiamo notare dal grafico di figura 90 come la goccia recuperi via via da tale allungamento fino a raggiungere un valore stazionario.

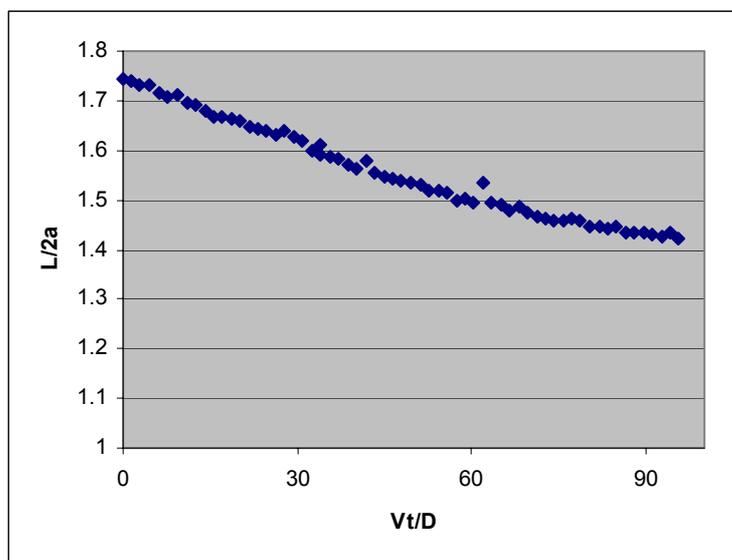


Figura 90. Transitorio di deformazione analizzato a partire dall'ingresso nel capillare

Il tempo zero corrisponde circa all'ingresso della goccia nel capillare, e dal valore del parametro di deformazione, si nota appunto come questa entri già allungata. Per valutare invece l'evoluzione del fenomeno, indipendentemente dalle modalità di caricamento della goccia, una volta introdotta la stessa, si è provveduto a stoppare il flusso, far rilassare la goccia, e ripartire dunque con il flusso da condizioni indeformate. In questo caso, valutando di nuovo l'evoluzione della deformazione della goccia nel tempo, si è notato che

il valore stazionario è raggiunto, indipendentemente dai valori di K e di Ca , in maniera monotona crescente, come mostrato nella seguente figura 91.

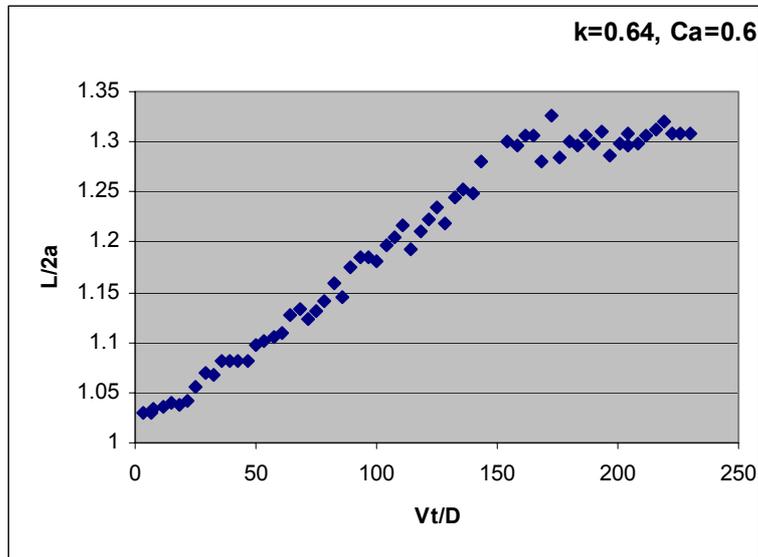


Figura 91. Transitorio di deformazione a partire da condizioni statiche

Va sottolineato che in questo caso il transitorio della goccia, è soggetto inizialmente anche al transitorio della pompa che genera il flusso. La durata del transitorio della pompa è stato valutato misurando il tempo che microparticelle disperse nella matrice esterna impiegano ad assumere la propria velocità di regime. Tale tempo costituisce soltanto il 15% circa di quello che le gocce impiegano ad andare a regime, non alterando quindi in maniera significativa le nostre misure. Riportiamo in figura 92 i transitori del parametro di deformazione a partire da una condizione statica di gocce di diverse dimensioni, tutte soggette allo stesso numero di capillare.

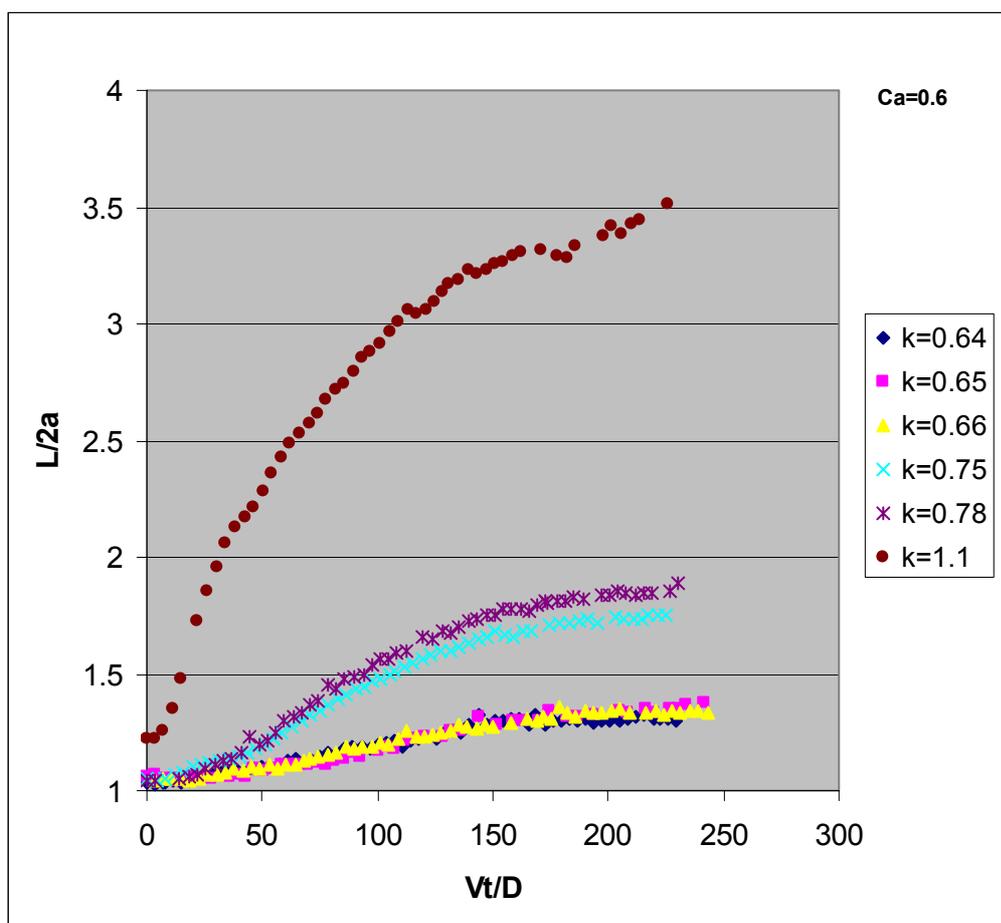


Figura 92. Confronto delle cinetiche di deformazione a diversi K

Notiamo che al crescere di K , cresce il tempo adimensionalizzato richiesto per raggiungere la condizione stazionaria, ma con una dipendenza da K non molto forte, tale tempo rimane infatti sempre dello stesso ordine di grandezza, anche per $K > 1$. Ancora per $K > 1$, notiamo che al tempo zero si parte da una condizione di deformazione già maggiore dell'unità, ciò che è facilmente intuibile in quanto la goccia inserita in un capillare più piccolo delle sue dimensioni parte leggermente deformata. Questa è anche la causa del flesso che notiamo per la curva a $K=1.1$, caso in cui la goccia deve appunto staccarsi dalle pareti del capillare prima di tendere alla sua forma stazionaria.

Valutiamo adesso la dipendenza dei transitori dal numero di capillare, analizzando due gocce di pari K soggette a diversi Ca .

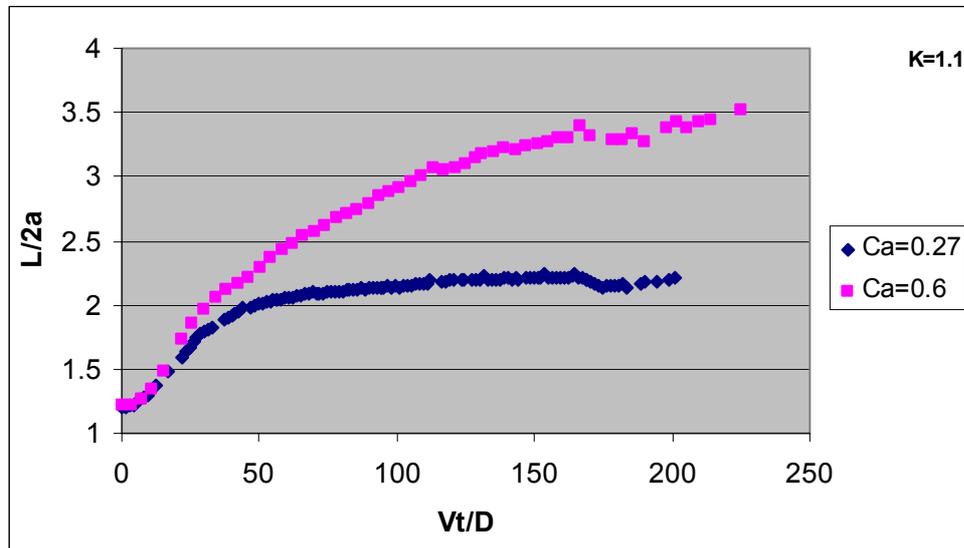


Figura 93. Confronto delle cinetiche di deformazione a diversi Ca

Come si può notare dal grafico sopra, il tempo per raggiungere lo stazionario aumenta al crescere di Ca , ma anche stavolta con una dipendenza non molto forte. Di seguito si riporta invece l'andamento del parametro di deformazione $L/2a$ al variare del tempo adimensionalizzato, per due gocce di dimensioni confrontabili ($k=0.9$ la prima e $k=0.7$ la seconda), soggette allo stesso numero di Ca (0.09), ma che iniziano la loro corsa da posizioni differenti rispetto all'asse del capillare. Il grafico di figura 94 riferisce ad una goccia che parte da una posizione assial-simmetrica.

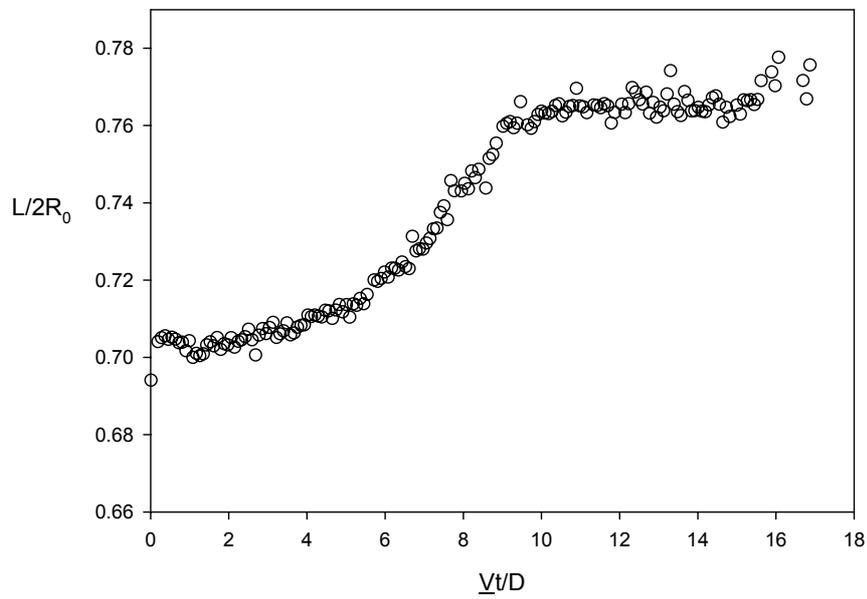


Figura 94. Cinetiche di deformazione di una goccia che parte in posizione assial-simmetrica

Si nota come il parametro di deformazione di questa goccia, come analizzato anche in precedenza, tenda in modo monotono al valore di regime.

Analizziamo ora invece, il caso di una goccia sottoposta ad un flusso che parte quando questa è attaccata ad una delle pareti.

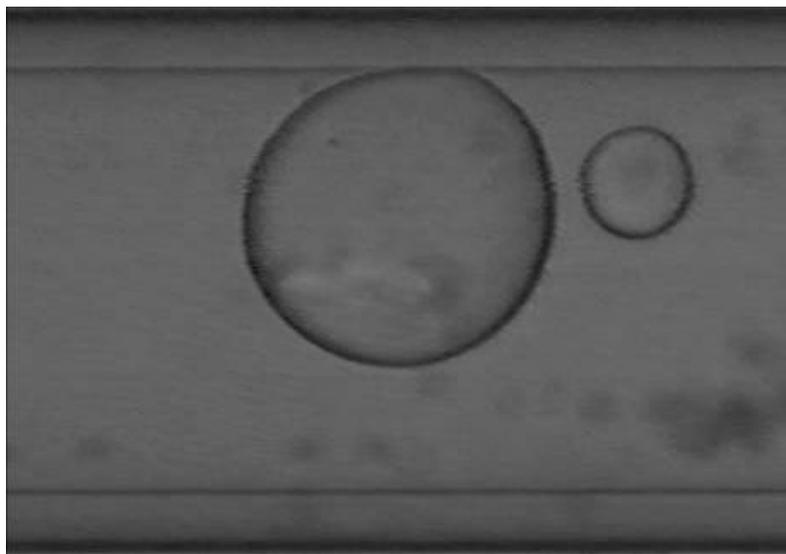


Figura 95. Goccia che parte da una posizione fuori asse.

Una volta partito il flusso, la goccia si stacca dalla parete e tende via via ad allinearsi lungo l'asse del capillare. Supportiamo la descrizione di tale comportamento, riportando di seguito il grafico della distanza del centro della goccia dall'asse normalizzata rispetto al raggio del capillare, contro il tempo adimensionalizzato, che mostra chiaramente l'andamento descritto.

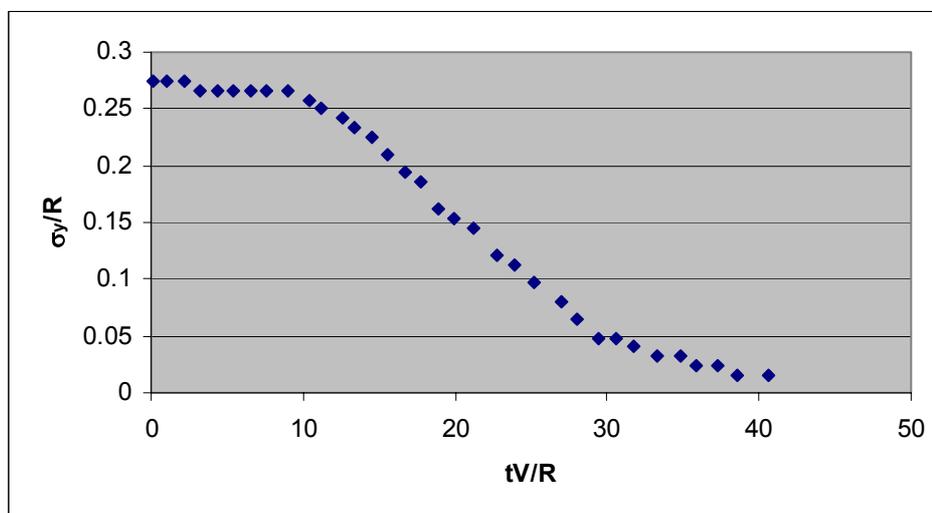


Figura 96. Allineamento della goccia lungo l'asse

Nel seguito si riporta il grafico del parametro di deformazione di questa stessa goccia.

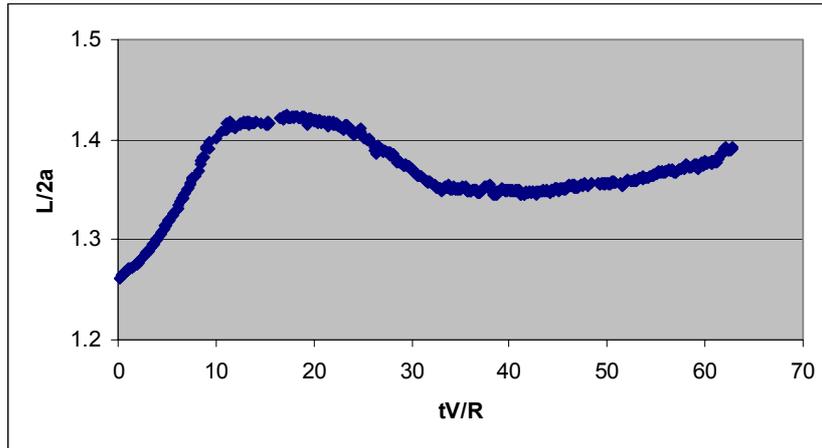


Figura 97. Cinetiche di deformazione di una goccia che parte in posizione di fuori asse.

Si noti la presenza all'inizio di un overshoot dovuto al distacco della goccia dalla parete, e di un successivo undershoot dovuto all'allineamento della goccia lungo l'asse del capillare. I tempi in cui infatti l'undershoot si estingue sono gli stessi di quelli in cui la distanza tra il centro della goccia e l'asse del capillare nel grafico precedente va a zero. Una volta allineatasi lungo l'asse, la goccia raggiunge il valore di deformazione stazionario in modo monotono.

3.7.2 Analisi morfologica

Nella tabella di immagini di seguito si riportano gocce allo stazionario, a K e Ca crescenti.

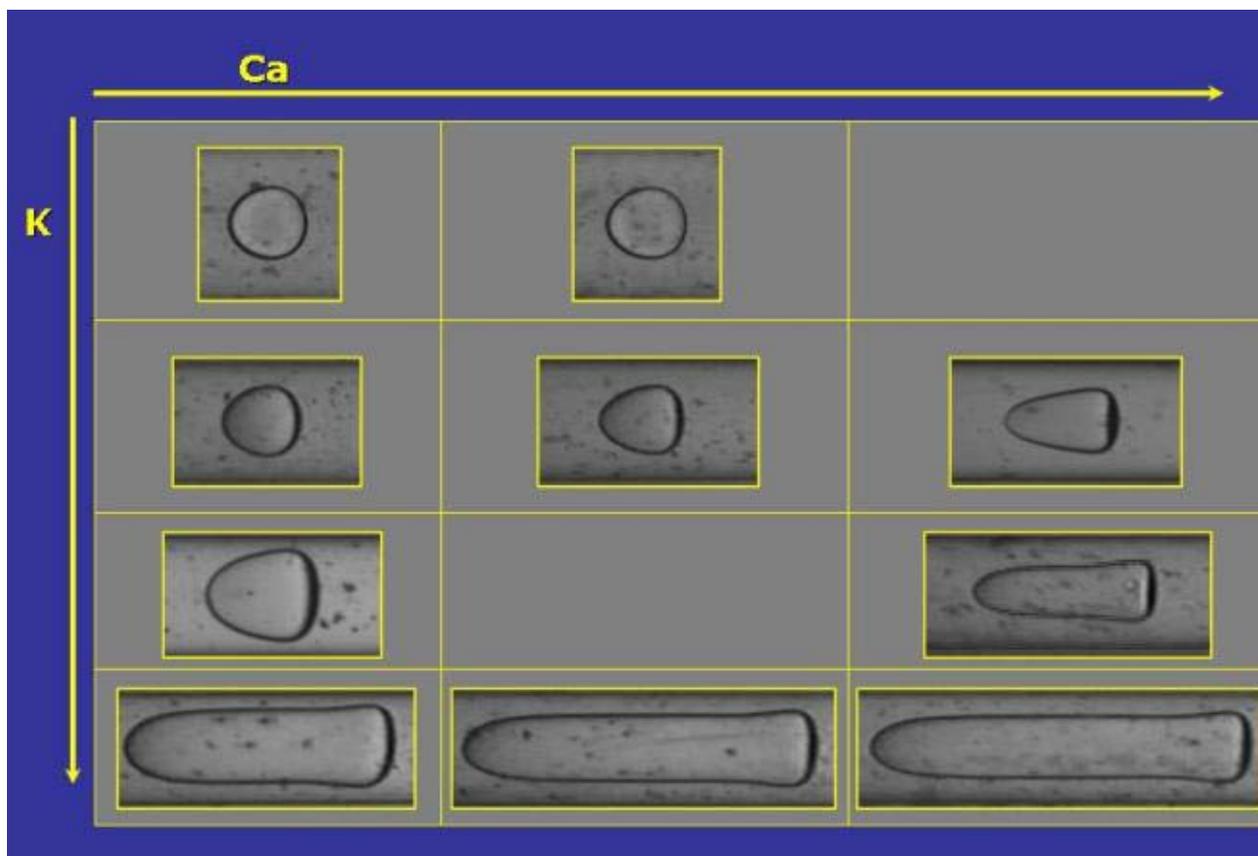


Figura 98. Morfologia al variare di K e di Ca

Immagini in una stessa riga si riferiscono a gocce di pari K, immagini in una stessa colonna si riferiscono a gocce sottoposte allo stesso numero di Ca. Si evince chiaramente come a bassi valori di K, la goccia si discosti solo di poco dalla sua forma iniziale sferica, formando una leggera punta nella zona anteriore, ed assumendo una forma che ricorda quella di un uovo, forma questa più pronunciata al crescere al numero di capillare. L'effetto di quest'ultimo si risente maggiormente via via che K aumenta, laddove la goccia inizia ad

assumere una forma a proiettile, con una punta diretta come il flusso ed una zona posteriore appiattita. Al crescere di K e di Ca , la goccia diventa via via più assottigliata e più allungata nella direzione del flusso, e per i valori più alti tra quelli analizzati di entrambi i parametri si nota un passaggio da una forma in qualche modo riconducibile ad un triangolo, ad una quasi cilindrica, se si eccettua la punta descritta sopra e la coda, leggermente bombata e più larga rispetto al resto della goccia stessa. Proprio rispetto alla coda, sottolineiamo ancora che l'aumento del numero di Ca porta ad un appiattimento via via maggiore di questa. A valori di portata e quindi di Ca ancora più alti, valori per i quali però con i mezzi sperimentali a disposizione non si sono riuscite a raggiungere le condizioni stazionarie, la coda assume una rientranza in direzione del flusso come mostrato nella figura successive, proprio come avviene nel caso dei globuli rossi.



Figura 99. Morfologia di una goccia soggetta a Ca elevati

Riportiamo adesso un'analisi quantitativa di quanto fin qui dedotto da una semplice analisi morfologica qualitativa. Il grafico che si riporta in basso mostra l'andamento della distanza minima δ tra la goccia e la parete del capillare, normalizzata rispetto al raggio del capillare stesso, al variare di K , per tre diversi numeri di Ca .

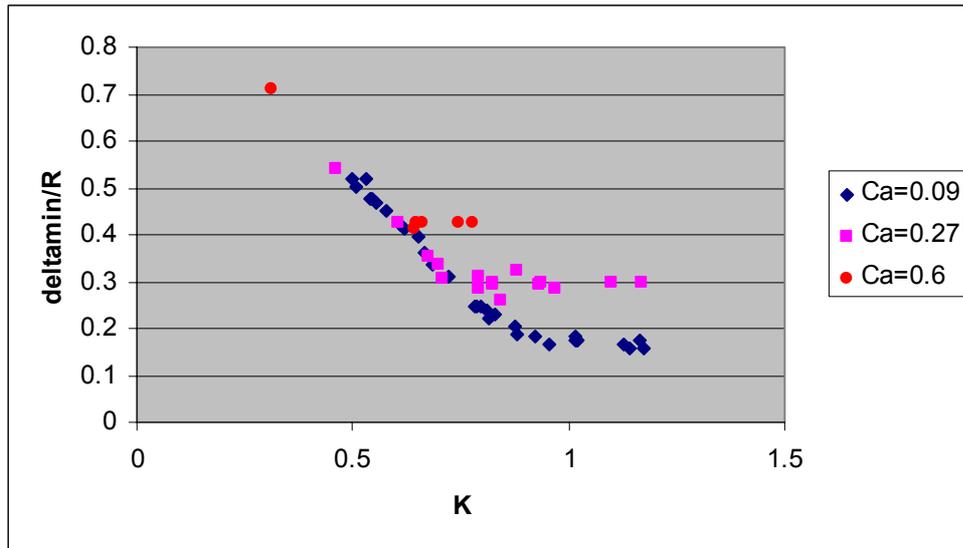


Figura 100. Andamento di δ_{min}/R Vs K , per tre diversi Ca

Si può notare come, per tutti i valori di Ca riportati, la distanza della goccia dal capillare tende a diminuire, come è ovvio attendersi, al crescere delle dimensioni della goccia, fino a raggiungere un plateau per valori di K vicini ad 1. Il raggiungimento di tale plateau sembra avvenire a K minori al crescere di Ca . Si nota altresì come la distanza della goccia dalle pareti del capillare tenda a crescere all'aumentare di Ca , ciò che misura appunto l'assottigliamento della goccia al crescere della portata del flusso cui è sottoposta. Notiamo infine che per bassi valori di K , l'effetto di Ca è meno pronunciato, così come avevamo anche precedentemente visto nell'analisi morfologica. Fino a $K \sim 0.6$ -

0.7 infatti le curve a diversi Ca sembrano quasi sovrapporsi, mentre si distanziano nettamente secondo l'andamento descritto per $K > 0.7$.

Nel grafico di figura 101 riportiamo invece l'andamento della lunghezza massima della goccia allo stazionario, normalizzata rispetto al diametro della goccia indeformata, al variare di K, di nuovo per gli stessi tre numeri di Ca.

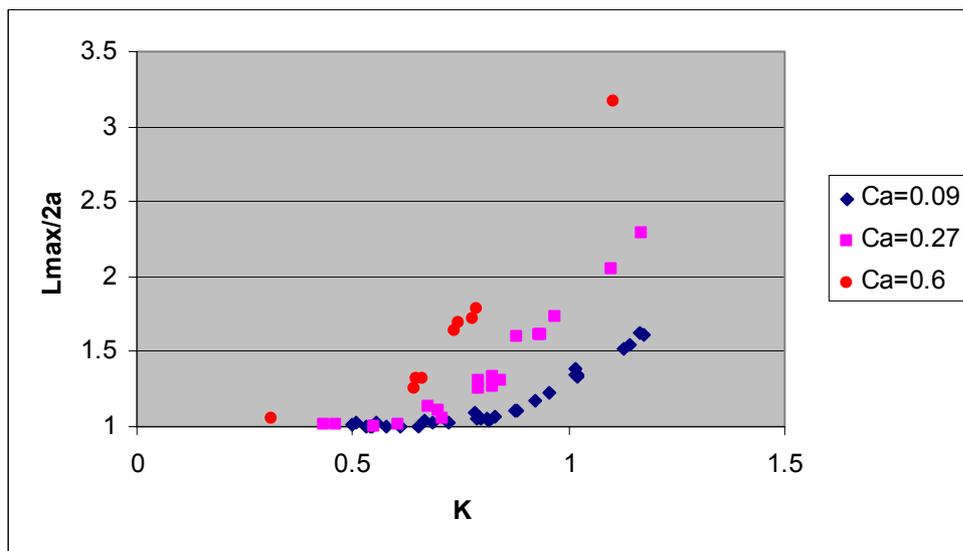


Figura 101. Andamento di $L_{max}/2a$ Vs K, per tre diversi Ca

In questo caso Ca e K agiscono nella stessa direzione, all'aumentare di questi parametri la goccia si allunga via via di più. L'allungamento in particolare diviene drammaticamente più rapido al crescere di K a partire da valori di circa 0.7 per questo parametro. Egualmente, l'effetto di Ca diviene significativo per valori di $K > 0.7$, fino ai quali invece il rapporto $L_{max}/2a$ è circa pari a 1, indipendentemente da Ca.

Come ultimo grafico riportiamo in figura.102 l'andamento della velocità della goccia rispetto alla velocità media del flusso alla Poiseulle al variare di K, ancora per tre diversi Ca. Notiamo subito che

mentre, come abbiamo visto, i globuli rossi si muovono esattamente alla velocità media del flusso alla Poiseuille, le gocce si muovono con una velocità che è maggiore della velocità media del flusso alla Poiseuille ma inferiore rispetto alla velocità massima di questo. U/V diminuisce, come ci si aspetterebbe, all'aumentare delle dimensioni della goccia rispetto a quelle del capillare, ma raggiunge poi un valore di plateau. Tale valore di plateau aumenta al crescere di Ca , e sembra iniziare a K minori al crescere di Ca , mentre fino a $K = 0,7$ i valori di U/V per i diversi Ca sembrano confrontabili ed in buon accordo con la formula teorica di Hetsroni valida appunto solo per K piccoli.

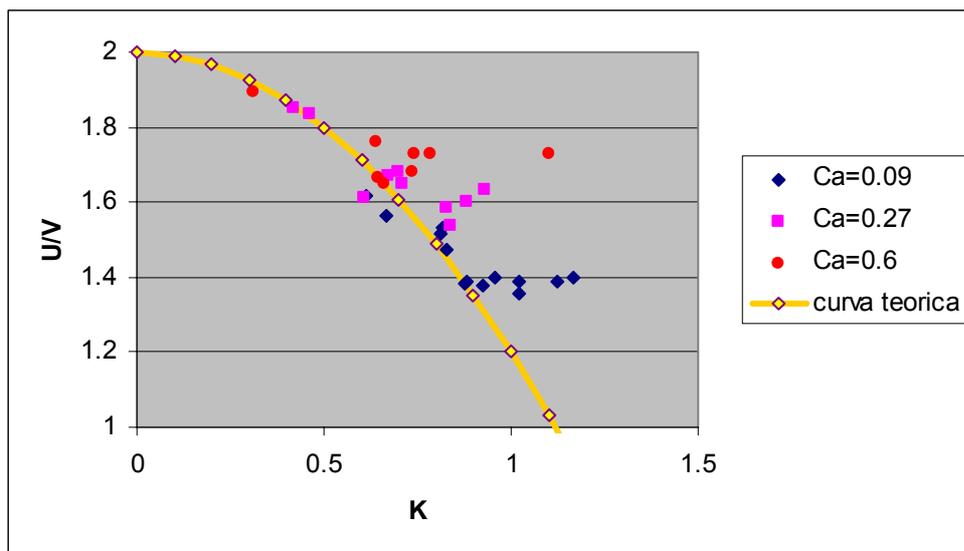


Figura 102. Andamento di U/V Vs K , per tre diversi Ca

I risultati fin qui esposti sono relativi ad esperimenti condotti a $\lambda=1$. I risultati a $\lambda=4$, al variare di K e Ca , seguono esattamente gli stessi andamenti mostrati per $\lambda=1$, ma con una deformazione maggiore, a parità di K e Ca , rispetto al caso di λ minore.

3.7.3 Campo di moto

Uno dei maggiori vantaggi per cui si ricorre alla messa a punto di un sistema modello, è la possibilità di muoversi su di un sistema dalle dimensioni uno o due ordini di grandezza maggiori rispetto a quelle del flusso eritrocitario. Ciò consente di studiare la fluidodinamica del fenomeno con maggiore semplicità e maneggevolezza. Nel presente studio, in particolare, si è scelto di inserire all'interno del flusso in capillare, della microparticelle di polistirene di diametro $2\ \mu\text{m}$, al fine di valutare il campo di moto intorno a gocce isolate, il campo di moto tra gocce che fluiscono in treno ed il campo di moto all'interno delle gocce stesse.

Analizzando il moto di tali microparticelle rispetto a quello delle gocce, si sono ottenuti i risultati che riportiamo di seguito. In figura.103, si mostra il campo di moto intorno ad una goccia isolata. Il sistema di riferimento ha lo zero nel centro della goccia.

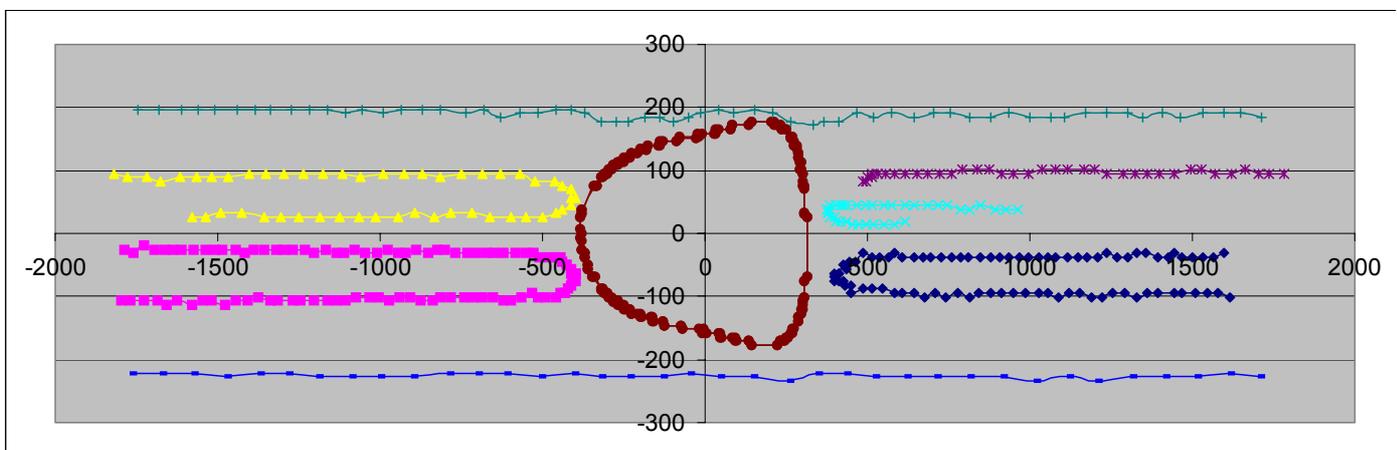
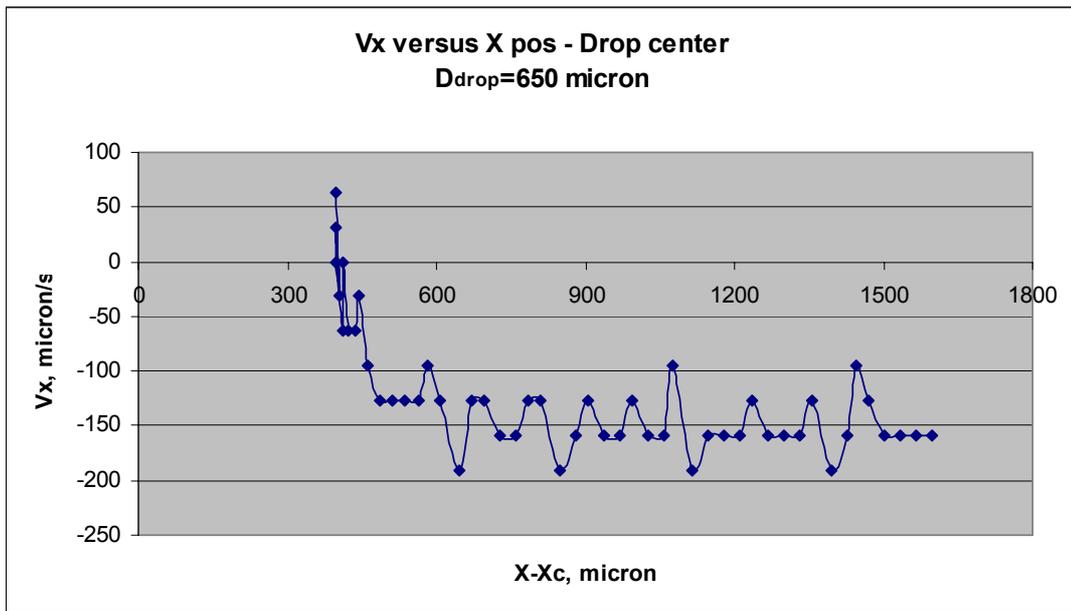


Figura 103. Linee di flusso intorno ad una goccia isolata

Si vede come le particelle in flusso nella zona posteriore della goccia si avvicinano a questa essendo dotate di velocità maggiore. Man mano che si avvicinano alla goccia le particelle risentono della sua presenza, diminuiscono di velocità, e ad un certo punto vengono spostate su di un'ordinata del capillare più lontana dal centro, iniziando a muoversi a velocità quindi inferiore. A questo punto la traiettoria si inverte nel movimento relativo goccia-fluido, e si vede un fluire indietro di tali particelle rispetto alla goccia. Discorso simmetricamente inverso per la zona del flusso anteriore rispetto alla goccia. La goccia inizia ad avvicinare le particelle davanti ad essa essendo più veloce. Quando le particelle sono vicine alla goccia, cambiano la propria ordinata portandosi verso il centro del capillare e aumentando quindi la loro velocità, ciò che, di nuovo, inverte la rotta, facendo allontanare le particelle dalla goccia. Per analizzare spazialmente a che distanza dalla goccia il flusso risenta della sua presenza, si riporta in figura 104 il grafico che mostra la velocità relativa del flusso/particella (zona posteriore) rispetto a quella della goccia, al variare della posizione della particella rispetto a quella del centro della goccia, ove appunto il grafico ha il suo zero.



i

Figura 104. Effetto della presenza di gocce sul campo di moto del fluido

esterno

Come si nota, tenendo conto che il diametro della goccia in questione risulta essere $650\ \mu\text{m}$, si può affermare che il flusso risente della presenza della goccia ad una distanza pari al diametro della goccia stessa.

Si è passati quindi ad analizzare, ricordando come i globuli rossi sottoposti a flusso in microcapillari si dispongano in fila, quale sia il campo di moto all'interno di un treno di gocce. La successiva sequenza temporale di immagini mostra un esempio.

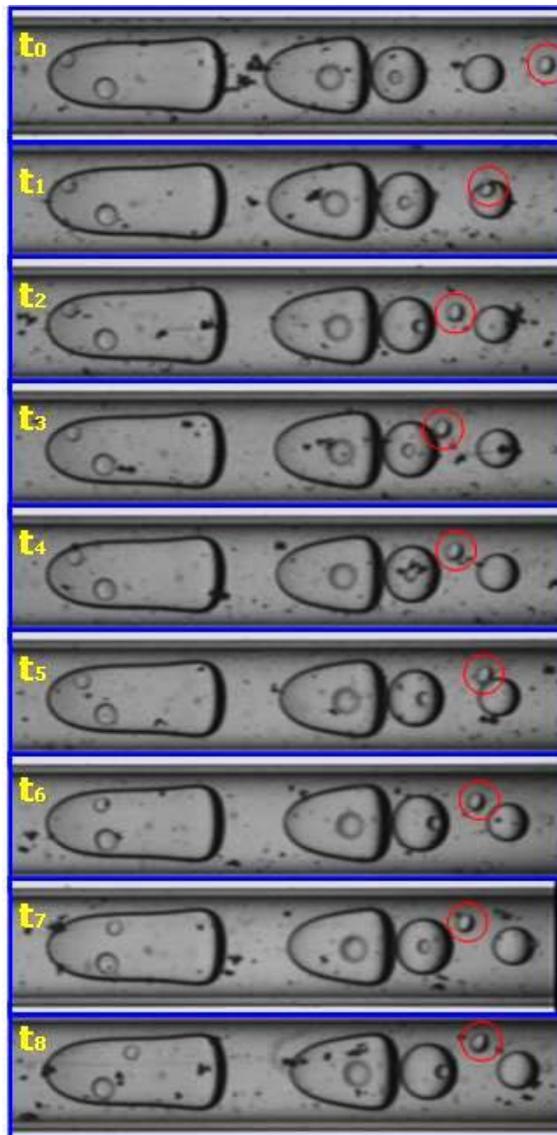


Figura 105. Linee di flusso in un treno di gocce

Si focalizzi l'attenzione sulla posizione nel tempo della gocciolina cerchiata in rosso. La gocciolina arriva da una zona priva di gocce ed entra nell'area confinata dalla presenza di due gocce successive. Una volta entrata in tale area, la gocciolina resta intrappolata, essendo quella tra due gocce una zona di ricircolo, in cui la gocciolina inizia a ruotare, come illustrato più chiaramente nella figura 106.

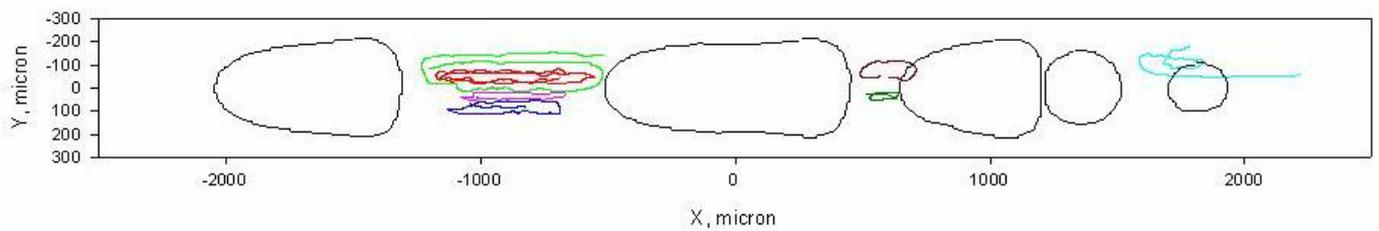


Figura 106. Schematizzazione delle linee di flusso in un treno di gocce

Concentriamoci ora su ciò che succede all'interno delle gocce stesse. Per bassi valori di K (al di sotto di 0.7) si osserva all'interno delle gocce un ricircolo intorno ad un punto della goccia stessa. Per gocce in asse, tale punto è prossimo al centro della goccia, mentre per gocce fuori asse tale punto tende a spostarsi verso l'estremità della goccia più distante dall'asse del capillare. Tali risultati sono in ottimo accordo con le simulazioni numeriche condotte da Couliette & Pozridikis (1998).

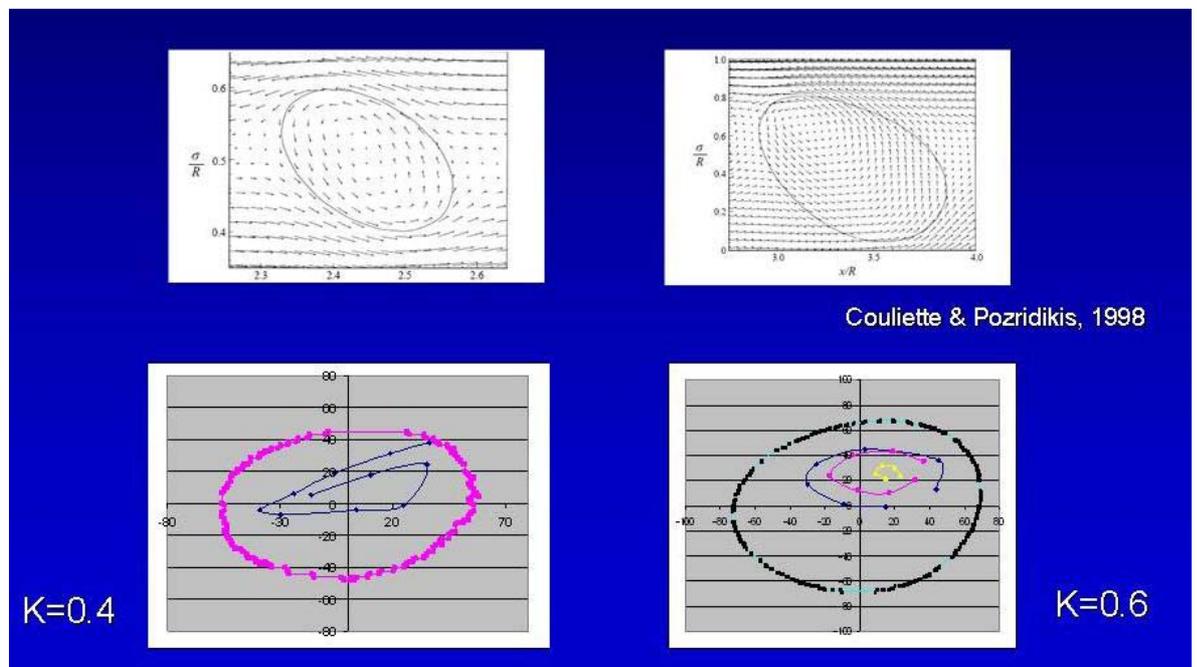


Figura 107. Linee di flusso per gocce con $K < 0.7$ e confronto con dati simulativi di letteratura

Diversa è la situazione invece in caso di $K > 0.7$, dove si nota la presenza di due zone di ricircolo nei due estremi della coda, ed una zona di ristagno in prossimità della punta della goccia.

L'immagine 108, si riferisce a due gocce entro le quali sono state immesse microparticelle di polistirene. Si distinguono chiaramente le

due zone di ricircolo in prossimità della coda. Come indicato dalle frecce rosse, e come ricostruito nella schematizzazione sotto, si nota come le particelle entrino ed escano dal piano di fuoco, ciò che sta ad indicare come il ricircolo si sviluppi anche lungo la terza direzione.

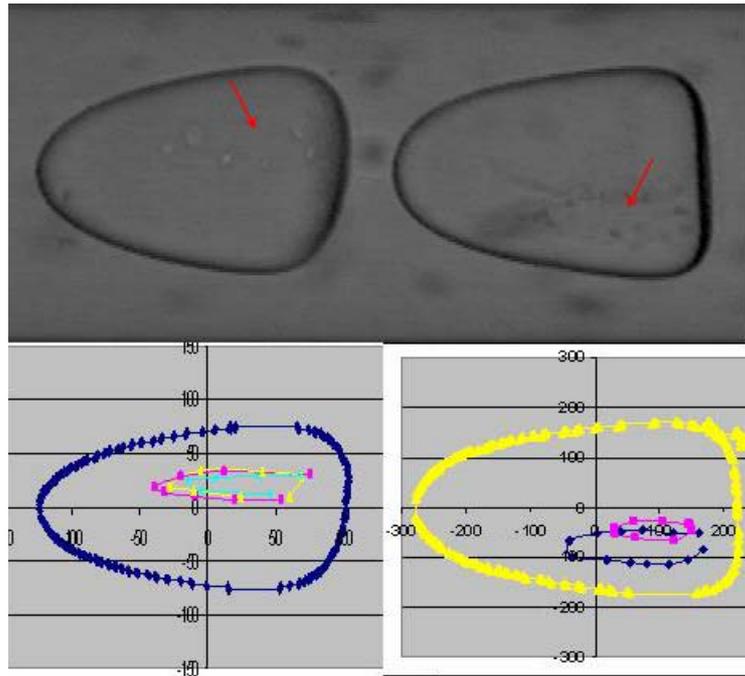


Figura 108. Linee di flusso interne a gocce con $K > 0.7$

La seguente sequenza di immagini invece, ci fa apprezzare la presenza di una zona di ristagno in prossimità della punta della goccia. Focalizzando infatti l'attenzione sulla gocciolina in essa contenuta, si nota come questa inizialmente avanzi rispetto alla goccia stessa, fino a bloccarsi una volta giunta appunto nella zona di ristagno in prossimità della punta.

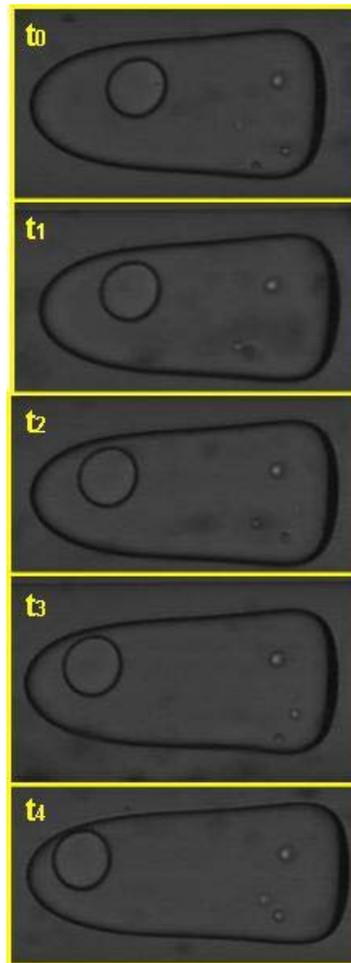


Figura 109. Zona di ristagno in prossimità della punta della goccia

Anche questo risultato sulle linee di flusso interne alla goccia è in ottimo accordo e dà per la prima volta supporto sperimentale ad un lavoro di simulazione numerica di Martinez & Udell del 1989, di cui si riporta di seguito un'immagine riassuntiva delle linee di flusso simulate per una goccia avente $K \sim 1$.

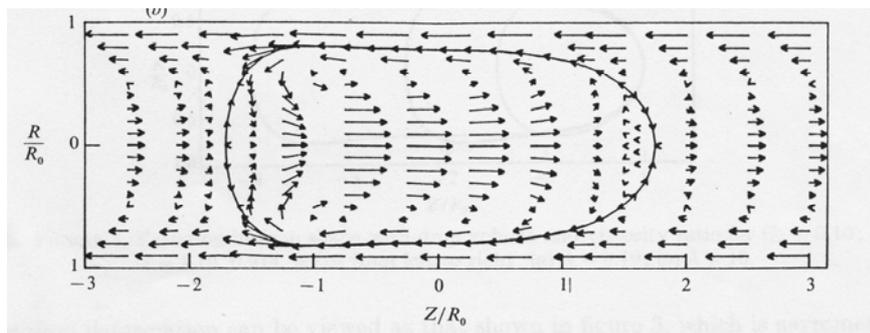


Figura 110. Simulazione di linee di flusso interne a gocce con $K > 0.7$,

Martinez & Udell (1989)

Richiamando il motivo per cui si è ricorsi alla messa a punto ed allo studio di un sistema modello, cioè l'analogia con il flusso eritrocitario, sottolineiamo come la riscontrata presenza di zone di riciclo (sia interne alla gocce che tra due gocce che fluiscono in fila) porti a pensare alla presenza di un meccanismo convettivo che, accanto a quello diffusivo, favorisca il trasporto di ossigeno dal sangue ai tessuti.

3.7.4 Break-up

Ricordiamo innanzitutto che gli unici dati in letteratura (Olbricht & King, 1992) relativi alla rottura di una goccia sottoposta a flusso in microcapillare si riferiscono al caso di $\lambda < 1$, e mostrano come la rottura avvenga attraverso l'ingresso *a getto* della fase continua dentro la goccia a partire dalla coda.

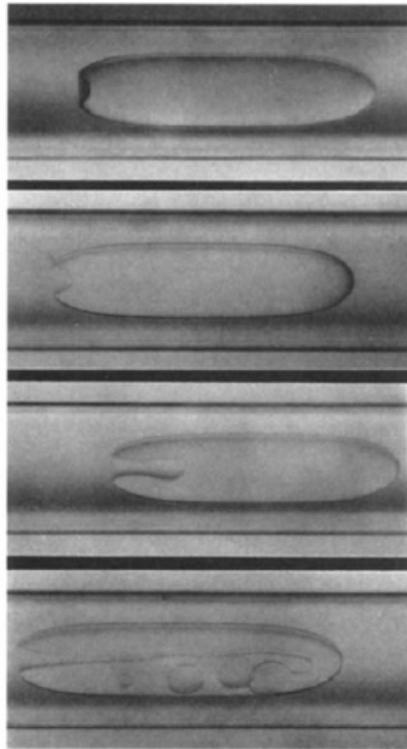


Figura 111. Break-up a $\lambda < 1$, (Olbricht & King, 1992)

Anche se nei nostri esperimenti non siamo riusciti a rompere la goccia in condizioni critiche, visto le tempistiche richieste, maggiori di quello che l'apparato sperimentale a disposizione permetteva, la rottura è stata ripresa in condizioni supercritiche. Sia nel caso di $\lambda = 1$ che nel caso di $\lambda > 1$, si è trovato che la rottura avviene tramite un

progressivo allungamento, della goccia, la coda in particolare inizia ad un certo punto ad assottigliarsi, sfilacciarsi ed a scomporsi, come mostrato dalle seguenti sequenze di immagini, la prima relativa al caso di $\lambda=1$, la seconda relativa al caso $\lambda=4$.

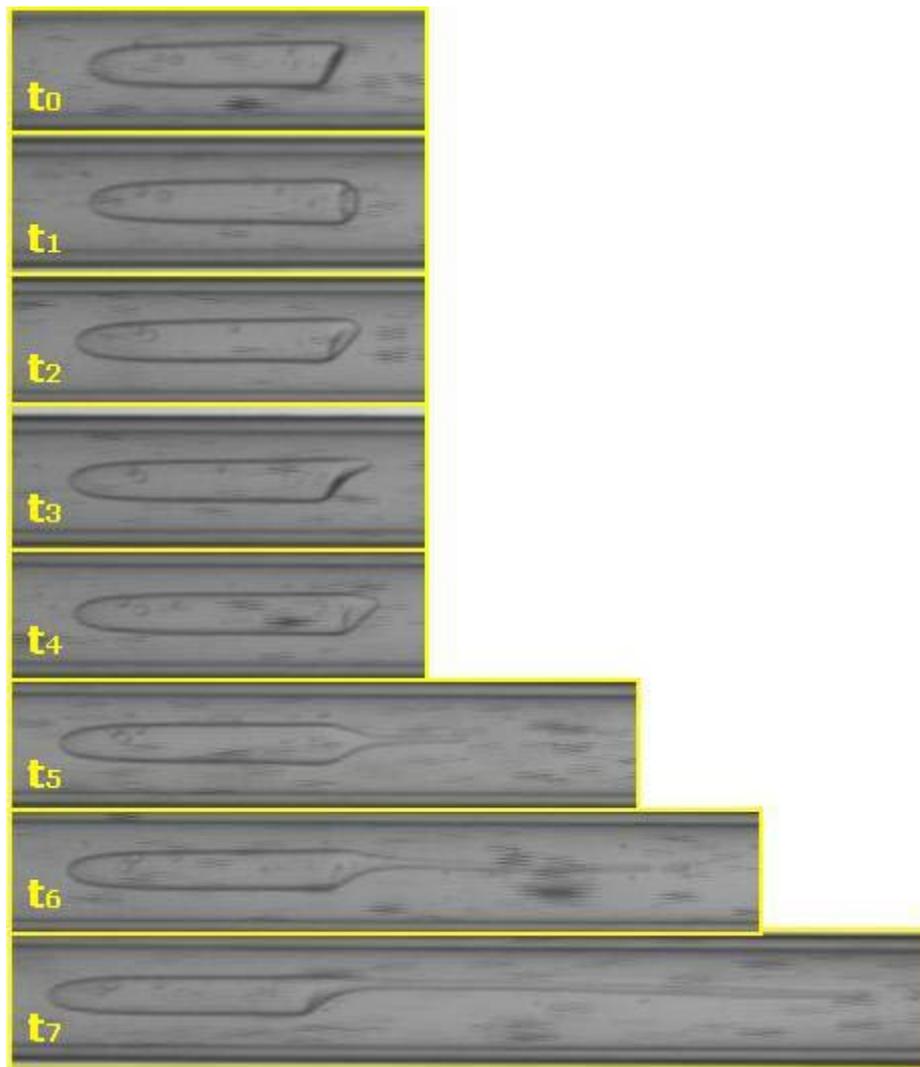


Figura 112. Break-up a $\lambda=1$

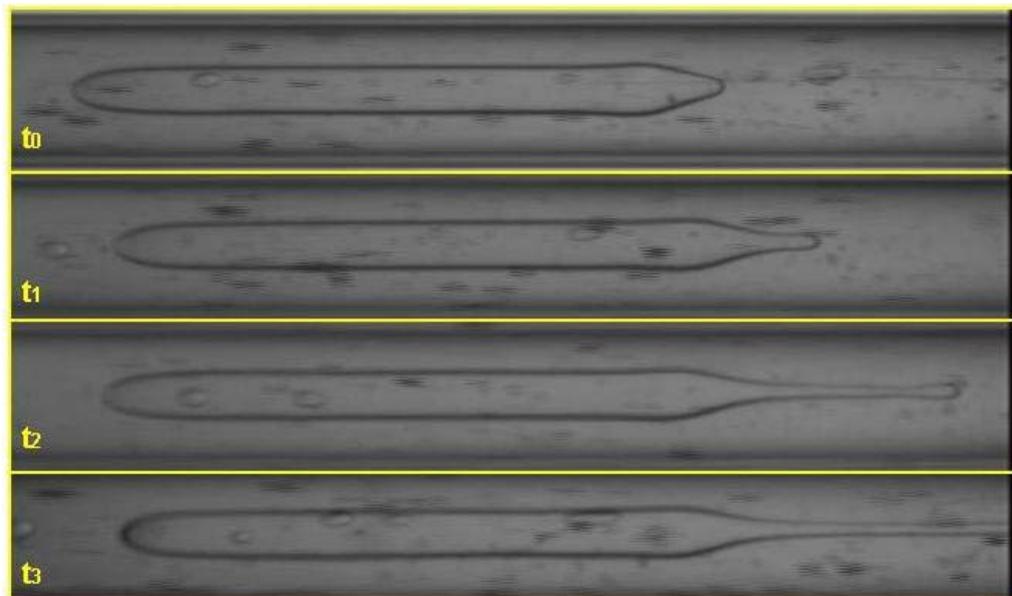


Figura 113. Break-up a $\lambda=4$

4 CONCLUSIONI

In conclusione, possiamo così riassumere i risultati raggiunti con il seguente lavoro di tesi di dottorato:

- ✓ Messa a punto di un apparato per l'analisi della deformabilità dei globuli rossi durante il flusso in microcapillari.
- ✓ Messa a punto di un apparato per l'analisi di gocce di dimensioni paragonabili a quelle del capillare durante il flusso di shear semplice ed il flusso di microcapillari.
- ✓ Effetti parete tendono a stabilizzare la forma delle gocce durante il flusso di shear semplice.
- ✓ La forma delle gocce durante il flusso alla Poiseulle, per $\lambda \geq 1$, richiama quella eritrocitaria.

✓ Fenomeni di ricircolazione internamente ed esternamente alle gocce suggeriscono la presenza di fenomeni convettivi, che, nel caso dei globuli rossi, possono facilitare lo scambio di ossigeno con i tessuti.

5 BIBLIOGRAFIA

1. Taylor, G. I., "The formation of emulsion in definable fields of flow", *Proceedings of the Royal Society of London: A*, **138**, 41-48, (1934).
2. G. Hetsroni, S. Haber, E. Wacholder, "The flow fields in and around a droplet moving axially within a tube", *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 41, (1970)
3. Gauthier, F., Goldsmith, H. L., Mason, S. G., "Particle motions in non-newtonian media II: Poiseuille flow", *Trans. Soc. Rheology*, **15**, 297-330 (1971).
4. Flumerfelt, R. W., "Drop breakup in simple scorrimento fields of viscoelastic fluids", *Industrial and Engineering Chemistry, Fundamentals*, **11 (3)**, 312-318, (1972).
5. B.P. Ho, L. G. Leal, "The creeping motion of liquid drops through a circular tube of comparable diameter", *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 71, part 2 (1975).
6. Hinch, E., Acrivos, A., "Long slender drops in a simple scorrimento flow", *Journal of fluid mechanics*, **98 (2)**, 305-328, (1980).
7. Rallison, J., "The deformation of small viscous drops and bubbles in scorrimento flows", *Annual Review of Fluid Mechanics*, **16**, 45-66, (1984).
8. T.W. Secomb, R. Skalak, N. Özkaya, J.F. Gross, "Flow of axisymmetric red blood cells in narrow capillaries", *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 163, (1986).
9. De Bruijn, R. A., "Deformation and breakup of drops in simple scorrimento flows", *Ph.D. thesis, Eindhoven University of Technology*, (1989).
10. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., "Molecular cloning", (1989)
11. Van de Ven, T. G. M., "Colloidal Hydrodynamics", *Academic Press, New York*, (1989).
12. C. Alonso, A.R. Pries, P. Gaehtgens, "Time-dependent rheological behaviour of blood flow at low shear in narrow horizontal tubes" *Biorheology*, **26**; 229-246, (1989)
13. M. Shapira , S. Haber, " " , *International Journal of Multiphase Flow*, **16**, 305 (1990).

14. W.L. Olbricht, D.M. Kung, “ The deformation of liquid drops in low Reynolds number flow through a capillary”, *Physics of fluids*, **4**, (1992).
15. Janssen, J. M. H., “Dynamics of liquid-liquid mixing”, *Ph.D. thesis, Eindhoven University of Technology*, (1993).
16. Isselbacher K. J., Braunwald E., Wilson J.D., Martin J. B., Fauci A. S., Kasper D. L., “Principi di medicina interna“, (1995)
17. Cao A. et al., Molecular diagnosis and carrier screening for Beta-thalassemia. *JAMA*, **278**, 1273-1277, (1997)
18. Zingoni A., Tognazzi F., Zingoni A., “Fisica bio-medica”, (1998)
19. C. Coulliette, C. Pozrikidis, “Motion of an array of drops through a cylindrical tube”, *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 358, (1998).
20. Guido, S., Villone, M., “Three dimensional shape of a drop under simple scorrimento flow”, *Journal of Rheology*, **42**, 395-415, (1998).
21. Ali Borhan and Jayanthi Pallinti, “Pressure Driven Motion of Drops and Bubbles through Cylindrical Capillaries: Effect of Buoyancy”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **37**, 3748-3759 (1998)
22. Henon S., Lenormand G., Richert A., Gallet F. “A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers”, *Biophysical Journal*, **76**, 1145-51, (1999)
23. Mighri, F., Ajji, A., Carreau, P. J., “Influence of elastic properties on drop deformation and breakup in scorrimento flow”, *Journal of Rheology*, **42**, 1477
24. D.R. Graham and J.J.L. Higdon, “Oscillatory flow of droplets in capillary tubes. Part 1 (Straight tubes) and Part 2 (Constricted tubes)”, *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 425, (2000).
25. Guido, S., Simeone, M., Alfani, A., “Interfacial tension of aqueous mixtures of Na-caseinate and Na-alginate by drop deformation in scorrimento flow”, *Carbohydrate polymers*, (2001).

26. Tsukada K., Sekizuka E., Oshio C., Minamitani H., “Direct measurement of erythrocyte deformability in diabetes mellitus with a transparent microchannel capillary model and high-speed video camera system”, *Microvascular Research*, **61**, 231–239 (2001)
27. Y. C. Fung “Biorheology” (2001)
28. Brandao M.M., Fontes A., Barjas-Castro M.L., Barbosa L.C., Costa F.F., Cesar C.L., Saad S.T., “Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease”, *European journal of haematology*, **70**, 207-11, (2003)
29. Shelby J.P., White J., Ganesan K., Rathod P.K., Chiu D.T., “A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes”, *PNAS*, **100**, 14618-22, (2003)
30. Pal R., “Rheology of concentrated suspensions of deformable elastic particles such as human erythrocytes”, *Journal of Biomechanics*, **36**, 981–989, (2003)
31. Wiwanitkit V., “A note in the acid citrate dextrose tube in the present usage”, *Haema*, **6**, 407-408, (2003)
32. Tura S., “Lezioni di ematologia”, (2003)
33. Oguz K. Baskurt, M.D., Ph.D. and Herbert J. Meiselman, Sc.D. “Blood Rheology and Hemodynamics”, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, volume **29**, number 5, 435- 447 (2003)
34. Pozrikidis C., “Axisymmetric motion of a file of red blood cells through capillaries”, *Physics of fluids*, **17**, (2005)
35. Popel A. S., Johnson P. C., “Microcirculation and hemorheology”, *Annu. Rev. Fluid Mech.*, **37**, 43–69, (2005)