



DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA INDUSTRIALE

DOCTORAL PROGRAMME IN INDUSTRIAL ENGINEERING

CICLO XXXIII

**EFFETTI BIOFISICI E BIOMECCANICI GENERATI DAI TRATTAMENTI AD
ULTRASUONI A BASSA INTENSITA' SU SFEROIDI TUMORALI PANCREATICI:
MODELLAZIONE AGLI ELEMENTI FINITI E SPERIMENTAZIONE IN VITRO**

**BIOPHYSICAL AND BIOMECHANICAL EFFECTS OF LOW INTENSITY
ULTRASOUND TREATMENTS ON PANCREAS TUMOR SPHEROIDS: FEM ANALYSIS
AND IN-VITRO EXPERIMENTS**

Settore Scientifico Disciplinare
ING-IND/34 BIOINGEGNERIA INDUSTRIALE

Dottorando

Ing. Mattia Dimitri

Supervisore

Prof. Andrea Corvi

Revisori Esterni

Prof.ssa Cristina Bignardi

Prof. Gerardo Catapano

Coordinatore Dottorato

Prof. Giampaolo Manfrida

Anni 2017/2020

INDEX

Abstract	4
Introduzione	5
1. TEORIA DEGLI ULTRASUONI PER LA BIOINGEGNERIA	
1.1. Propagazione degli ultrasuoni	9
1.1.1. Accoppiamento ultrasonoro	10
1.2. Generazione degli ultrasuoni	12
1.3. Tecniche di controllo degli ultrasuoni	16
1.4. Intensità Acustica	18
1.5. Effetti fisici degli ultrasuoni in ambito medico	23
1.5.1. Effetti termici	23
1.5.2. Effetti meccanici	25
1.6. Applicazioni degli US a Bassa Intensità	27
1.7. L'apoptosi cellulare	27
1.7.1. La proliferazione delle cellule tumorali	30
1.8. Metodi di sperimentazione in letteratura	32
1.8.1. Test Sperimentali: Attenuazione US su tessuto EX-Vivo	33
1.8.2. Risultati Sperimentali	39
2. METODOLOGIE DI INDAGINE E CARATTERIZZAZIONE DI SFEROIDI TUMORALI PANCREATICI	
2.1. Importanza delle proprietà meccaniche sul comportamento cellulare	42
2.2. Tipologie di tumori e caratteristiche associate	45
2.3. Il Pancreas e le sue proprietà meccaniche	47
2.4. Sferoidi: culture cellulari 3D idali	49
2.5. Indagini microscopiche	50
2.5.1. Microtomografia a raggi X	51
2.5.2. Microscopia a fluorescenza: confocale vs lightsheet	55
2.5.2.1. MATLAB post-processing delle immagini microscopiche	59

2.6. Introduzione alle tecniche di indentazione per i soft tissues	66
2.6.1. Progettazione di una piattaforma per indentazione di soft tissues	68
2.7. Microscopia a Forza Atomica (AFM)	70
2.7.1. Acquisizione immagine topografica in modalità non a contatto	71
2.7.2. Acquisizione immagine topografica e misure di forza in modalità a contatto	76
2.7.2.1. Analisi delle curve ed elaborazione dei dati	79
3. MODELLAZIONE AGLI ELEMENTI FINITI DI UN TRATTAMENTO LICU SU SFEROIDE PANC-1	
3.1. Comportamento Cellulare: modelli Iperelastici	87
3.1.1. Mooney Rivlin	88
3.1.2. Modello di Ogden	91
3.2. Modellazione 3D dell'insieme e strategie di ottimizzazione	96
3.3. Definizione della Mesh e dei vincoli	99
3.4. Definizione dei Carichi	101
3.5. Analisi dei risultati e definizione dei possibili effetti Biomeccanici	102
4. REALIZZAZIONE DI UN SETUP SPERIMENTALE PER LA STIMOLAZIONE LICU-LIPUS	
4.1. Concept Design e realizzazione del Setup ad US ad immersione	103
4.2. Scelta del trasduttore ad US	106
4.2.1. Caratterizzazione del fascio ad US e mappatura del campo di pressione a 1,2,3 MHz	109
4.3. Progettazione dei supporti e strategie per la calibrazione del set-up sperimentale alle diverse frequenze	117
4.4. Circuito di Matching e massimo trasferimento di Potenza	117
4.5. Calibrazione con idrofono ad immersione	121
5. STIMOLAZIONE LICU IN VITRO DI SFEROIDI CELLULARI TUMORALI PANC-1	
5.1. Processo di incubazione e posizione degli sferoidi	128
5.2. Protocollo di stimolazione LICU	130
5.3. Indagine istologica con marcatori a fluorescenza	135
CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	137
RINGRAZIAMENTI	141
PUBBLICAZIONI	142
APPENDICE	144
BIBLIOGRAFIA	160

ABSTRACT

Le applicazioni degli ultrasuoni(US) in campo medico per i trattamenti terapeutici sono da almeno 2 decenni sotto la lente di ingrandimento da parte di numerosi gruppi di ricerca che hanno messo a punto numerosi setup sperimentali ed attraverso i quali hanno individuato diversi protocolli promettenti che inducono effetti biologici e biomeccanici sulle cellule dei tessuti trattati: le divergenze delle sperimentazioni che si possono individuare in letteratura risiedono principalmente nella dimensione della sonda ad US, il range di frequenze utilizzate, l'intensità del campo acustico, il tempo di esposizione, il tipo di tessuto trattato, lo stadio di oncogenesi delle cellule trattate e la modalità di stimolazione (contatto/distanza). Una chiara distinzione è però individuabile in base all'intensità degli US ed al conseguente andamento della temperatura durante il trattamento, infatti se quest'ultima rimane in un range di $\pm 2^{\circ}\text{C}$ si può ragionevolmente ritenere che gli effetti indotti sulla struttura cellulare sono di tipo meccanico. La sonoporazione o la sonicazione sono due particolari effetti che possono condurre la cellula ad apoptosi e sono generati da un processo di cavitazione acustica (stabile o instabile) attraverso l'applicazione di un trattamento a Low Intensity (Continuous/Pulsed) Ultrasound (LICUS/LIPUS). Nel caso alternativo in cui l'aumento di temperatura sia l'effetto predominante con incrementi che possono raggiungere gli $80\text{-}100^{\circ}\text{C}$ si parla di trattamenti ipertermici, identificabili in letteratura come High Intensity Focused Ultrasound (HIFU).

Questo lavoro di tesi si focalizza sui trattamenti ad US a bassa intensità ponendosi come obiettivo finale l'individuazione di un protocollo di stimolazione efficace per indurre un processo di apoptosi/lisi/disgregazione di un agglomerato di cellule (sferoide) tumorali. Per raggiungere tale obiettivo ed associare ai risultati una correlazione tra gli effetti biofisici e biomeccanici indotti dal trattamento ad US nella cultura cellulare bersaglio e le sue proprietà costitutive meccaniche sono stati esplorati più metodi di analisi microscopica. Dai risultati delle analisi condotte è stato possibile acquisire le informazioni necessarie alla costituzione di un modello tridimensionale robusto e condurre su di esso delle analisi agli elementi finiti: simulazione di campo di pressione acustica transitorio a diverse frequenze (1,2,3,5 MHz) per la valutazione dello stato di stress generato. Al termine della fase di simulazione del protocollo da testare in vitro si è proceduto con la fase di

validazione dei risultati di simulazione attraverso una sperimentazione in vitro che ha richiesto la progettazione e messa in opera di un setup ad US ad immersione dedicato alla stimolazione di culture cellulari 3D(sferoidi) di tumorali pancreatici (Panc-1). Questa fase estremamente delicata ha richiesto il costante coordinamento di un team multidisciplinare (Biologi, Ingegneri, Medici) ed interdipartimentale (Dipartimento di Ingegneria Industriale DIEF, Dipartimento di Ingegneria Dell'Informazione DINFO, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica DMSC): da questa collaborazione è nato un robusto protocollo operativo sperimentale che ha permesso di raggiungere ragguardevoli risultati di ricerca nonostante il difficile periodo pandemico. In questo elaborato saranno enucleati in modo più chiaro possibile i passi che sono stati effettuati per raggiungere gli obiettivi prefissi, questo al fine di rendere ripetibile la sperimentazione condotta anche su altre tipologie di cellule con la speranza che questa attività di ricerca possa aprire la strada verso la realizzazione e la sperimentazione di un dispositivo ad US selettivo per il trattamento percutaneo oncologico.

ABSTRACT

The applications of ultrasound (US) in the medical field for therapeutic treatments have been under the magnifying glass for at least 2 decades by numerous research groups that have developed numerous experimental setups and through which they have identified several promising protocols that induce biological and biomechanical effects on the cells of the treated tissues: the divergences of the experiments that can be identified in the literature mainly reside in the size of the US probe, the range of frequencies used, the intensity of the acoustic field, the exposure time, the type of treated tissue, the stage of oncogenesis of the treated cells and the modality of stimulation (contact / distance). However, a clear distinction can be identified based on the intensity of the US and the consequent temperature trend during treatment, in fact if the latter remains in a range of ± 2 ° C it can reasonably be assumed that the effects induced on the cellular structure are of mechanical type. Sonoporation or sonication are two particular effects that can lead the cell to apoptosis and are generated by a process of acoustic cavitation (stable or unstable) through the application of a Low Intensity (Continuous / Pulsed) Ultrasound (LICUS / LIPUS) treatment. In the alternative case in which the temperature increase is the predominant effect with increases that can reach 80-100 ° C we are talking about hyperthermic treatments, identifiable in the literature as High Intensity Focused Ultrasound (HIFU).

This thesis focuses on low-intensity US treatments with the ultimate goal of identifying an effective stimulation protocol to induce a process of apoptosis / lysis / disintegration of an agglomeration of

tumor cells (spheroid). To achieve this objective and to associate the results with a correlation between the biophysical and biomechanical effects induced by the US treatment in the target cell culture and its mechanical constitutive properties, several methods of microscopic analysis were explored. From the results of the analysis it was possible to acquire the information necessary to build a robust three-dimensional model and conduct finite element analysis on it: simulation of a transient acoustic pressure field at different frequencies (1,2,3,5 MHz) for the evaluation of the state of stress generated. At the end of the simulation phase of the protocol to be tested in vitro, we proceeded with the validation phase of the simulation results through an in vitro experimentation which required the design and implementation of a US immersion setup dedicated to the stimulation of cultures. 3D cells (spheroids) of pancreatic tumors (Panc-1). This extremely delicate phase required the constant coordination of a multidisciplinary team (Biologists, Engineers, Doctors) and interdepartmental (DIEF, DINFO, DMSC): from this collaboration a robust experimental operational protocol was born which allowed to achieve remarkable research results despite the difficult pandemic period. In this paper the steps that have been taken to achieve the objectives will be enucleated as clearly as possible, in order to make the experimentation conducted on other types of cells repeatable with the hope that this research activity can pave the way towards the realization and experimentation of a selective US device for percutaneous oncological treatment.

INTRODUZIONE

Gli ultrasuoni (US) sono generalmente definiti come onde di pressione che possono generare moti vibratorii nei mezzi che attraversano, con frequenze di oscillazione comprese tra 0.5 MHz e 15 MHz. L'applicazione degli US si trova in diversi ambiti: dalla metallurgia, in cui sono utilizzati per i controlli non distruttivi al fine di indagare sulla presenza di difetti in un materiale, alle applicazioni chimiche ed anche, ad esempio, per le esplorazioni subacquee. Una grande famiglia di applicazioni degli ultrasuoni interessa il campo medico: il loro utilizzo riguarda sia l'ambito diagnostico che l'ambito terapeutico. Nel campo diagnostico, gli ultrasuoni sono alla base del funzionamento di sistemi basati sull'analisi elastografica come ad esempio l'ecografia, che sfrutta le informazioni sulla connesse alla variazione di densità tra diverse sezioni di tessuto attraversati dal segnale ad US, per ricostruire delle immagini digitali a cui sono applicabili metodi di visualizzazione real time basta sull'analisi dei dati acquisiti. Le applicazioni maggiormente diffuse in ambito terapeutico, si concentrano sul ramo fisioterapico e la rigenerazione tissutale; meno diffuso è altresì il loro impiego in campo oncologico per le difficoltà che saranno approfondite in questa tesi. A tal proposito è opportuno fare una prima classificazione in due famiglie distinte con riferimento all'Intensità Acustica utilizzata durante il trattamento: Ultrasuoni ad Alta Intensità (High Intensity Ultrasound - HIUS) ed Ultrasuoni a Bassa Intensità (Low Intensity Ultrasound - LIUS) [1]. Gli HIUS trovano applicazione nelle tecniche di termoablazione oncologica che mirano alla distruzione del tessuto oncologico sfruttando la focalizzazione del fascio ad US mediante sistemi di lenti: con questa tecnica si possono indurre elevati incrementi termici locali che possono portare ad una completa ablazione della massa bersaglio (High Intensity Focused Ultrasound – HIFU) [2][3][4]. L'approfondimento dei LIUS è stato negli anni intermittente nei materiali e metodi di indagine, questo approccio ha delineato, con riferimento agli ultimi 5 anni, 3 filoni di ricerca distinti che percorrono prevalentemente strade parallele con i loro obiettivi ma che talvolta si sovrappongono per quanto riguarda la tipologia degli effetti biofisici o biomeccanici indotti nel tessuto trattato.

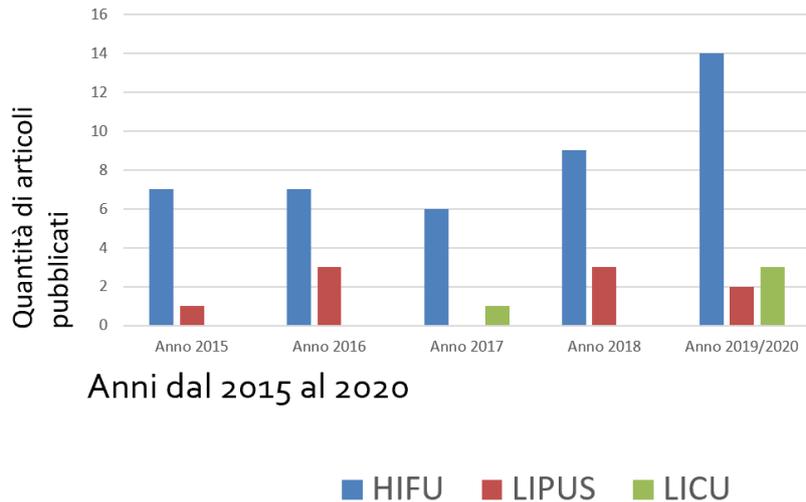


Figura 1: Volumi delle pubblicazioni in ambito terapeutico, e taglio prevalentemente ingegneristico, con diversa modalità di impiego degli US individuati nei database disponibili per la ricerca (Scopus / Google Scholar / PubMed).

Con riferimento alla figura 1 si individua chiaramente come l'applicazione degli HIFU risulti la maggiormente approfondita ed indagata, probabilmente per ragioni connesse alla maggiore facilità di individuazione di effetti ipertermici nel tessuto e quindi la messa a punto dei dispositivi e dei protocolli di trattamento; più timido risulta l'approccio alla tecnica degli US mediante l'uso della Pulsazione del segnale (LIPUS), con Duty-Cycle variabile, che verrà approfondito maggiormente nel capitolo dedicato; infine solo negli ultimi anni è stato maggiormente approfondito l'uso degli US mediante segnali Continui nel tempo (LICU) e modulati prevalentemente in frequenza e tempo complessivo di esposizione al campo acustico. Questo ultimo campo di applicazione ha permesso di osservare gli effetti terapeutici antitumorali su diverse linee cellulari ed mettere in luce la diversa sensibilità al trattamento tra cellule malate e cellule sane dello stesso fenotipo: in particolare l'esposizione ai LIUS è capace di generare simultaneamente più effetti sulle cellule tumorali: inibirne la proliferazione dovuto alla sovrappressione di membrana causato dal fascio ad US, indurre in apoptosi la cellula a causa della rottura di membrana per gli sforzi di taglio dovuti ad effetti cavitativi o incrementare la permeabilità della membrana ad agenti chemioterapici. Inoltre l'uso di questa tecnica rispetto agli HIFU ha ulteriori vantaggi legati alla riduzione dei danni collaterali [5][6] che la tecnica ipertermica deve affinare per risultare efficiente: la quasi totalità di assenza di effetti termici non pone il problema del controllo della temperatura durante i trattamenti che preverrebbero bruciature cutanee o danni collaterali al tessuto limitrofo alla zona sottoposta al trattamento; inoltre la maggiore selettività di questa tipologia di trattamento nei confronti delle cellule potrebbe essere indispensabile per preservare il tessuto sano ed estendere tale concetto alla rigenerazione utilizzata in campo fisioterapico [7], quest'ultimo è un campo di ricerca completamente aperto su cui ancora ci sono numerose domande a cui non sono state trovate le risposte. La maggior parte degli studi

sull'effetto terapeutico antitumorale dei LIUS sono stati condotti maggiormente su cellule isolate o sospensioni cellulari 2D coltivate *in vitro* ed hanno permesso di individuare i principali effetti indotti sul tessuto ed i classificarli [8]; solo recentemente vengono usati per queste tipologie di ricerche culture cellulari 3D ideali che rappresentano più fedelmente il comportamento di un agglomerato tumorale in vivo ma non è stata ancora individuata in modo univoca la correlazione che lega le proprietà meccaniche della cultura cellulare alla risposta del trattamento ad US.

L'obiettivo che si pone questo dottorato di ricerca è l'approfondimento delle proprietà biomeccaniche degli sferoidi tumorali pancreatici e degli effetti biofisici e biomeccanici indotti da un trattamento ad Ultrasuoni a Bassa Intensità (LIUS) [9][10]. Per raggiungere tale obiettivo sono state approfondite ed usate diverse tecniche di indagine microscopica (Lightsheet, Confocale a Fluorescenza, AFM, Microtomografia a raggi X) e successivamente, per trattare gli sferoidi, è stato progettato e realizzato, mediante tecniche di produzioni additive e produzione tradizionali, un set-up sperimentale ad immersione per eseguire una stimolazione ottimale di culture cellulari 3D coltivate su terreno di cultura (Agarosio) che riproducessero al meglio le condizioni di una massa tumorale in vivo. Per ottenere dei risultati paragonabili su tutte le sessioni sperimentali è stato messo a punto un protocollo rigoroso sia nella calibrazione del set-up e nel suo impiego che nel protocollo di prelievo, trattamento, ed analisi delle cellule trattate e di quelle di controllo.

CAPITOLO 1

TEORIA DEGLI ULTRASUONI PER LA BIOINGEGNERIA

In questo capitolo saranno trattati i principali aspetti connessi agli ultrasuoni (US) e alla loro applicazione in campo medico in cui sono largamente diffusi per uso diagnostico ma che recentemente vengono anche impiegati per uso terapeutico. Inoltre sarà presentata una prima applicazione sperimentale che è stata condotta per individuare un range di valori di frequenza idonei al trattamento che si intende realizzare al termine di questo lavoro. Tale sperimentazione preliminare ha permesso di comprendere al meglio le difficoltà sull'utilizzo e la calibrazione di strumentazione di laboratorio per progettare con maggior attenzione il setup definitivo per la sperimentazione sugli sferoidi pancreatici tumorali.

Gli US sono fondamentalmente onde sonore con frequenze comprese tra 0.5 MHz e 15 MHz, superiori alla banda di frequenze udibili all'orecchio umano (16 Hz ÷ 20 KHz). Si tratta di vibrazioni meccaniche che si caratterizzano per la loro propagazione solo attraverso un mezzo fisico di supporto, diversamente dalla luce che può trasmettersi anche nel vuoto. Ogni mezzo può considerarsi composto da un elevato numero di particelle normalmente a riposo, ma se perturbate da un'onda ultrasonica oscillano intorno alla loro posizione di equilibrio. La velocità di propagazione dell'ultrasuono dipende dalla natura del mezzo; se λ è la lunghezza d'onda, f la frequenza dell'onda e T periodo, la velocità di propagazione nel mezzo v sarà (Figura 2):



$$v = \lambda * f \quad \left[\frac{m}{s} \right] \quad 1.$$

$$\text{con } f = \frac{1}{T} \quad [Hz] \quad 2.$$

Figura 2: Grandezze fondamentali che caratterizzano un'onda.

La resistenza al passaggio del fascio US nel mezzo è espressa attraverso l'impedenza acustica Z :

$$Z = \rho v \quad [Ns/m^2] \quad 3.$$

con ρ densità del mezzo e v velocità di propagazione degli US.

Nei tessuti biologici la velocità di propagazione può considerarsi in prima approssimazione costante. Fa eccezione il tessuto osseo, per il quale la marcata attenuazione del fascio US, dovuta alla maggiore densità e minore compressibilità rispetto ai tessuti molli, comporta un valore di velocità pari a circa il doppio rispetto agli altri tessuti. Convenzionalmente il valore medio della velocità di propagazione per il tessuto soft è pari a 1540 m/s.

1.1 PROPAGAZIONE DEGLI US

La propagazione degli ultrasuoni può avvenire secondo differenti modalità:

- *Onde longitudinali o di compressione*: lo spostamento delle particelle rispetto alla loro posizione di riposo avviene nello stesso verso della propagazione del fascio ultrasonoro; la direzione di vibrazione coincide con quella di propagazione ed è perpendicolare al piano emittente della sonda.
- *Onde trasversali o di taglio*: lo spostamento delle particelle è normale al senso di propagazione del fascio US, mentre la direzione dell'oscillazione delle particelle, sottoposte a sollecitazione di taglio, è perpendicolare alla direzione di propagazione.

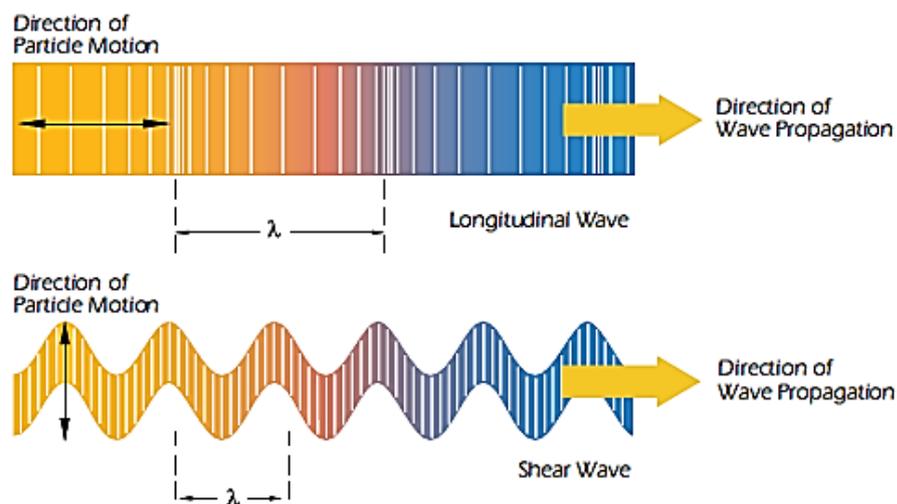


Figura 3: Spostamento delle particelle confrontato con la direzione di propagazione di onde longitudinali e di taglio.

- *Onde superficiali o di Rayleigh*: hanno la caratteristica di propagarsi solo nello strato superficiale dei solidi, seguendo il profilo del pezzo in assenza di brusche variazioni di forma; in questo caso la direzione di vibrazione delle molecole è perpendicolare alla superficie del pezzo.
- *Onde di Lamb*: interessano i materiali dove lo spessore è inferiore alla lunghezza d'onda degli ultrasuoni che li attraversano.

All'interno dei solidi, dotati di reticolo cristallino, la propagazione può avvenire tramite onde longitudinali, trasversali, superficiali e di Lamb. Nei liquidi e nei gas, privi del reticolo cristallino, avviene solo attraverso onde longitudinali. Nei tessuti biologici soft, la propagazione delle onde superficiali e delle onde di Lamb è difficilmente rilevabile.

Analogamente alle onde luminose, quelle ultrasonore sono soggette a tre fenomeni fondamentali nei punti di interfaccia tra zone a diversa impedenza acustica:

- *Riflessione*. Una piccola parte dell'onda viene riflessa con lo stesso angolo incidente e si propaga in direzione opposta.
- *Trasmissione*. Una parte dell'onda viene trasmessa e prosegue il suo cammino nel mezzo, generalmente con un angolo diverso rispetto a quello incidente.
- *Rifrazione*. Variazione dell'angolo dell'onda trasmessa rispetto all'onda incidente, secondo la legge di Snell:

$$\frac{\sin\theta_i}{\sin\theta_t} = \frac{v_1}{v_2} \quad 4.$$

dove il pedice i si riferisce all'onda incidente, t a quella trasmessa, v_1 e v_2 sono le velocità di propagazione delle onde rispettivamente nei mezzi 1 e 2 (Figura 4).

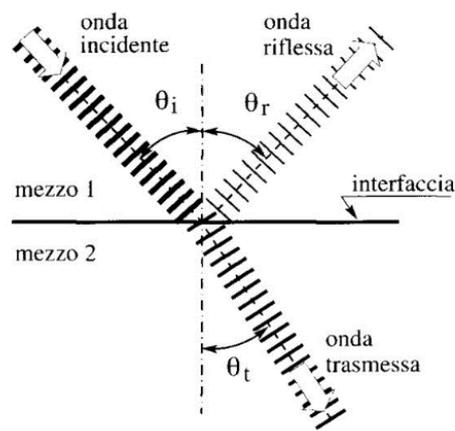


Figura 4: Legge di Snell

A causa dell'eterogeneità dei materiali che attraversano, gli ultrasuoni sono soggetti al fenomeno dell'attenuazione: si tratta di una progressiva riduzione dell'ampiezza dell'onda durante la sua propagazione e comprende sia l'energia persa per assorbimento sia quella persa per diffusione.

L'*assorbimento* è dovuto allo scorrimento relativo delle particelle del mezzo per permettere il passaggio dell'onda, ostacolato dalla viscosità, che porta alla trasformazione di parte dell'energia associata alle stesse particelle in calore. La *diffusione* è legata alle caratteristiche fisiche del materiale, in particolare alla più o meno marcata eterogeneità, ed agisce disperdendo il fascio US in più direzioni generando attenuazioni del fascio lungo l'asse di propagazione. L'attenuazione aumenta con l'aumentare della distanza percorsa dagli US e con l'aumentare della frequenza. È misurata con una scala in decibel (dB) così definita:

$$dB = 20 \log\left(\frac{I_1}{I_2}\right) \quad 5.$$

in cui I_1 e I_2 rappresentano le intensità del segnale rispettivamente prima e dopo l'attenuazione. Da un punto di vista matematico, il coefficiente di attenuazione è la somma algebrica del coefficiente di assorbimento e del coefficiente di diffusione. Generalmente si parla di attenuazione dell'intensità acustica e l'espressione esponenziale che la rappresenta è la seguente:

$$I(x) = I_{(0)} e^{-\alpha x} \quad 6.$$

dove $I_{(x)}$ è l'intensità nel punto di interesse x , $I_{(0)}$ l'intensità originaria, x la distanza attraversata dal fascio US e α il *coefficiente di attenuazione*. Tale coefficiente è in funzione della distanza percorsa dal fascio US, della frequenza del fascio e della temperatura e viene comunemente espresso in dB/cm.

Nella maggior parte dei tessuti biologici il coefficiente di attenuazione è circa 0.5 - 1 dB/cm/MHz (Figura 5). In particolare, nei tessuti molli il contributo maggiore dell'attenuazione è legato al fenomeno di assorbimento. Il potere di penetrazione degli US è inversamente proporzionale alla frequenza, mentre il coefficiente di attenuazione del fascio è direttamente proporzionale ad essa.

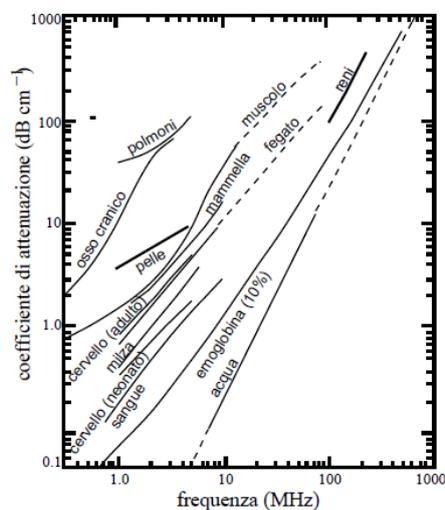


Figura 5: Attenuazione di alcuni tessuti biologici. L'intensità degli US decresce esponenzialmente con la distanza per l'assorbimento dell'energia (coefficiente α): la caduta è più ripida al crescere della frequenza.

Nella seguente tabella (Tabella 1) sono riportati alcuni valori indicativi di densità, velocità di propagazione, impedenza acustica e attenuazione per alcuni materiali di interesse clinico.

	Densità (kg m ⁻³)	Velocità di propagazione (m s ⁻¹)	Impedenza acustica (kg m ⁻² s ⁻¹)	Attenuazione (dB cm ⁻¹ MHz ⁻¹)
Aria	1,3	330	429	>10
Acqua	1000	1480	1,5*10 ⁶	0,002
Grasso	900	1450	1,3*10 ⁶	0,6
Muscolo	1080	1585	1,7*10 ⁶	1,5
Polmone	220	900	0,2*10 ⁶	30
Sangue	1030	1570	1,6*10 ⁶	0,18
Osso	1850	4000	7,4*10 ⁶	8

Tabella 1: Valori indicativi di densità, velocità di propagazione, impedenza acustica e attenuazione per alcuni materiali di interesse clinico

1.1.1 ACCOPPIAMENTO ULTRASONORO

Gli ultrasuoni vengono fortemente attenuati dall'aria, risulta quindi fondamentale definire il concetto di accoppiamento tra sonda e pezzo da testare che è ottenuto mediante un opportuno fluido, normalmente costituito da acqua (spesso emulsionata) od oli minerali con viscosità variabile a seconda dell'impiego. Le funzioni a cui assolve il fluido di accoppiamento sono riassunte di seguito:

- Inumidire le superfici;
- Escludere la presenza di bolle di aria;
- Riempire le irregolarità superficiali;
- Consentire il movimento della sonda.

Alla luce di queste funzioni, le caratteristiche generiche del fluido sono le seguenti:

- Trasparenza;
- Impedenza acustica costante;
- Coefficiente di attenuazione costante;
- Assenza di diffusione (fluido omogeneo e isotropo).

1.2 GENERAZIONE DEGLI ULTRASUONI

Gli US sono generati per effetto piezoelettrico, che è strettamente legato alle proprietà di alcuni materiali di generare una tensione elettrica proporzionale alla pressione esercitata su di essi e, viceversa, di deformarsi (contrazione o espansione monodirezionali) alla frequenza di applicazione del carico di tensione, generando onde di pressione nell'ambiente circostante.

Le *sonde ultrasonore* sono trasduttori utilizzati per generare ultrasuoni (Figura 6). L'elemento attivo delle sonde è il *cristallo piezoelettrico*: se sottoposto a forze di trazione o compressione in un'opportuna direzione rispetto agli assi cristallografici, il cristallo produce delle cariche sulle facce caricate e l'energia meccanica ad esso trasferita attraverso l'azione di deformazione viene così trasformata in parte in energia elettrica; tale fenomeno è del tutto reversibile. La trasformazione da energia elettrica in energia meccanica è sfruttata per l'emissione del fascio US, mentre il fenomeno inverso viene utilizzato per la ricezione del segnale US. I cristalli piezoelettrici hanno generalmente una forma circolare, quadrata o rettangolare e la frequenza di oscillazione è una caratteristica tipica del cristallo. I cristalli piezoelettrici usati per generare frequenze superiori ai 10 MHz sono in genere al quarzo. Per frequenze inferiori si usano materiali piezo-ceramici, come il titanato di bario. Tra gli altri componenti fondamentali in una sonda a US ci sono il *blocco di smorzamento (backing)*, realizzato di materiale altamente attenuante e ad alta densità per controllare la vibrazione del trasduttore assorbendo l'energia che irradia dalla faccia posteriore dell'elemento attivo, e la *piastrina antiusura (wear plate)*, per proteggere il trasduttore da danneggiamenti accidentali o dalla contaminazione di agenti esterni.

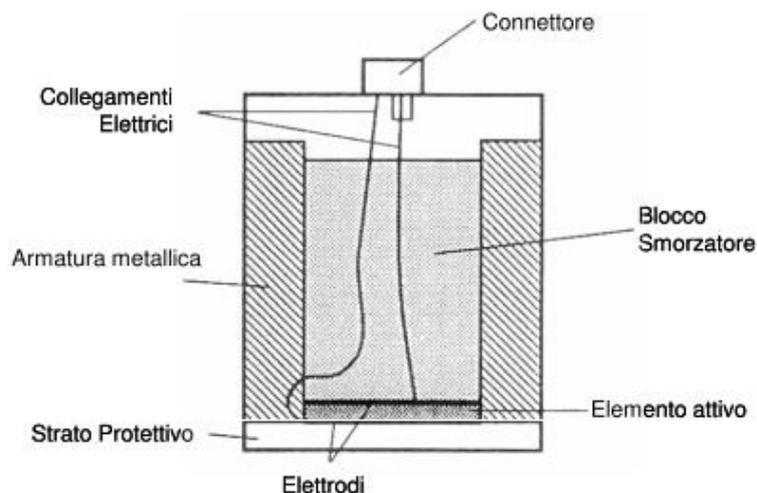


Figura 6: Schematizzazione di una sonda ad ultrasuoni.

Le sonde per indagine ultrasonora possono essere classificate in base a vari criteri. In base al tipo di impiego, per esempio, si hanno *sonde a contatto* e *sonde per immersione*. Una seconda distinzione è in funzione dell'angolo di emissione, ovvero dell'inclinazione del cristallo emettitore rispetto alla superficie del provino. Si distinguono le *sonde diritte*, in cui il cristallo è parallelo a tale superficie, e le *sonde angolate*. Un'ulteriore classificazione tiene conto della forma del fascio US emesso dalla sonda, distinguendo così le *sonde piane* dalle *sonde focalizzate*.

- *Sonde piane*. Poiché il trasduttore ha dimensioni finite, si possono individuare due distinte regioni di propagazione, separate da un piano detto fuoco naturale e posto ad una distanza NF dalla superficie del trasduttore:

$$NF = \frac{d^2}{4\lambda} \quad 7.$$

dove d è il diametro del trasduttore e λ la lunghezza d'onda del fascio. Tali regioni sono la *zona di campo prossimo o zona di Fresnel*, in cui il fascio US ha forma cilindrica e si estende dalla superficie del trasduttore fino alla distanza N , e la *zona di campo lontano o zona di Fraunhofer*, dove il fascio US assume una forma troncoconica divergente e tende a presentare caratteristiche di maggiore stabilità (Figura 7).

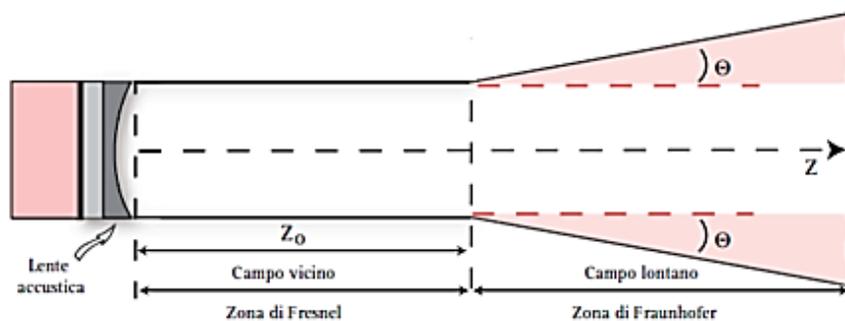


Figura 7: Campo vicino e campo lontano (sonda piana).

- *Sonde focalizzate*. Si tratta di sonde con cristallo singolo, concepite in modo da concentrare l'energia emessa in una zona limitata. Usando sistemi di lenti acustiche o modellando la superficie dell'elemento piezoelettrico si fa in modo di concentrare virtualmente l'emissione su una linea o su un punto (Figura 8).

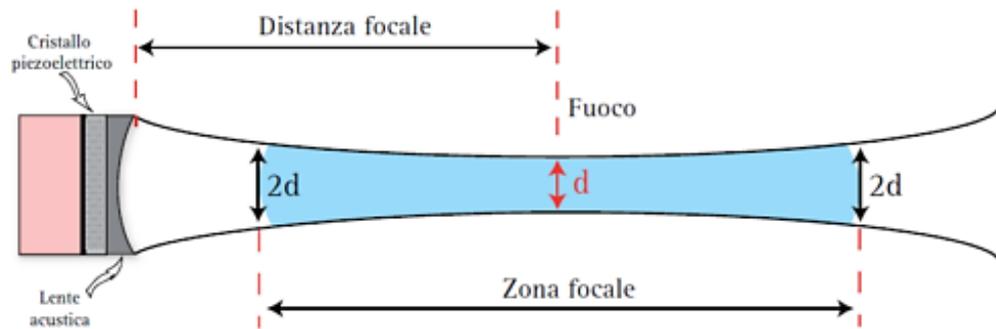


Figura 8: Parametri caratteristici del fascio focalizzato.

1.3 TECNICHE DI CONTROLLO DEGLI ULTRASUONI

In ambito meccanico, gli US sono utilizzati per effettuare controlli non distruttivi sui componenti e verificare la presenza di eventuali difetti. Esistono due grandi famiglie di tecniche di controllo (Figura 9):

- La tecnica pulse-echo;
- La tecnica per trasmissione.

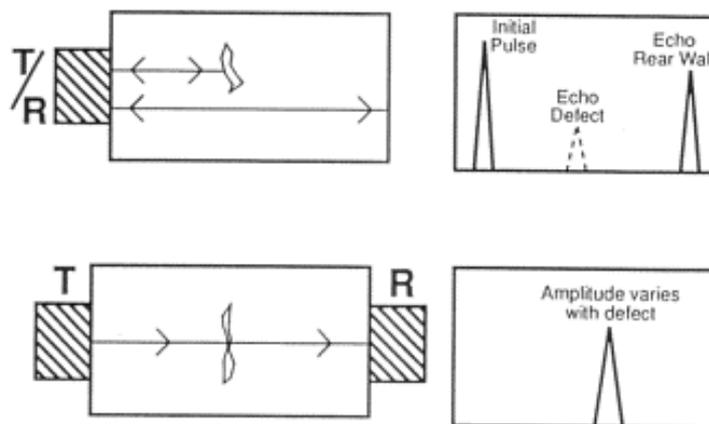


Figura 9: Tecniche di controllo a US. In alto: tecnica pulse-echo. In basso: tecnica per trasmissione.

Con la *tecnica pulse-echo* le onde ultrasoniche investono il pezzo da testare, penetrano in esso e vengono riflesse e rifratte dalle superfici che delimitano il componente stesso e dalle superfici di discontinuità. Sono proprio le riflessioni interne (echi) ad essere esaminate e quindi fornire informazioni sulla presenza di eventuali difetti nel pezzo. Nei controlli in riflessione si impiega un solo trasduttore che incorpora in sé le funzioni di trasmissione (T) e ricezione (R) del segnale. Gli echi significativi sono quelli dovuti all'incontro dell'onda US con la superficie frontale del provino

(front echo) e con quella del fondo del provino (back echo). Se il materiale presenta dei difetti tra questi due echi si hanno ulteriori echi intermedi. La distanza temporale tra eco frontale ed eco di fondo, nota la velocità di propagazione del fascio US nel provino, permette di calcolare lo spessore del pezzo. La tecnica che utilizza un'unica sonda necessita di un fascio US ad impulsi, per evitare che vi sia sovrapposizione tra fase emittente e fase ricevente. La non coincidenza tra queste due fasi è responsabile di una zona lungo l'asse del fascio US in cui non è possibile effettuare nessun controllo. Tale zona prende il nome di "zona morta". Si tratta della porzione del fascio US adiacente alla superficie di emissione del trasduttore, in cui la presenza di eventuali imperfezioni non può essere rilevata, poiché la sonda non può ricevere fino al termine della trasmissione. L'estensione della zona morta dipende dalla velocità di propagazione nel mezzo e dalla durata dell'impulso.

Nelle *tecniche in trasmissione* si esamina esclusivamente l'onda che ha attraversato il corpo senza tenere in considerazione gli echi riflessi. Prevedono l'impiego di due trasduttori contrapposti, aventi lo stesso asse ultrasonoro, uno dei quali emette il fascio di onde ultrasoniche (T) mentre l'altro, posto sulla superficie opposta a quella di ingresso delle onde, raccoglie le onde stesse dopo che esse hanno attraversato il pezzo e sono state riflesse dalle eventuali discontinuità incontrate lungo il percorso. È importante mantenere le due sonde sull'asse ultrasonoro. Dal momento che si utilizzano due sonde, una emittente e l'altra ricevente, può essere usata un'emissione del fascio ad impulsi oppure continua.

Fino ad ora si è fatto riferimento a sonde monocristallo, in cui è presente un solo elemento attivo. Esistono anche sonde a doppio elemento, in cui sono racchiusi due cristalli separati opportunamente da un isolante acustico. Uno dei due elementi trasmette il segnale, mentre l'altro lo riceve. Infine, si menzionano le sonde costituite da una serie di elementi piezoelettrici (array), disposti in modo lineare o curvilineo, stimolati in genere in sequenza con opportuni ritardi per regolare il fronte d'onda.

Le applicazioni degli ultrasuoni in campo medico e biologico sono ampiamente diffuse e ne è stato dimostrato l'elevato valore. Tali applicazioni possono essere classificate in due macro famiglie: applicazioni diagnostiche e applicazioni terapeutiche. I parametri caratteristici degli ultrasuoni in base a questa classificazione sono riassunti nella Tabella 2.

Una grande famiglia di applicazioni degli ultrasuoni interessa il campo medico: il loro utilizzo riguarda sia l'ambito diagnostico che l'ambito terapeutico. Nel campo diagnostico, gli ultrasuoni sono alla base del funzionamento di sistemi basati sull'analisi elastografica come ad esempio l'ecografia, che sfrutta le informazioni sulla connesse alla variazione di densità tra diverse sezioni di tessuto attraversati dal segnale ad US, per ricostruire delle immagini digitali a cui sono applicabili metodi di visualizzazione real time basta sull'analisi dei dati acquisiti. Le applicazioni maggiormente diffuse in ambito terapeutico, si concentrano sul ramo fisioterapico e la rigenerazione tissutale; meno diffuso è

altresì il loro impiego in campo oncologico per le difficoltà che saranno approfondite in questa tesi. A tal proposito è opportuno fare una prima classificazione in due famiglie distinte con riferimento all'Intensità Acustica utilizzata durante il trattamento: Ultrasuoni ad Alta Intensità (High Intensity Ultrasound - HIUS) ed Ultrasuoni a Bassa Intensità (Low Intensity Ultrasound - LIUS) [1].

	FREQUENZA	PRESSIONE ACUSTICA
DIAGNOSI	2,5÷7,5 MHz	< 0,1 MPa
TERAPIA A BASSA INTENSITA'	0,5÷5 MHz	0,1±1,5 MPa
TERAPIA AD ALTA INTENSITA'	0,8÷7 MHz	> 10 MPa

Tabella 2: Parametri degli ultrasuoni secondo la classificazione per applicazioni Biomedicali [1].

1.4 INTENSITÀ ACUSTICA

L'intensità acustica misura il flusso di energia per unità di superficie ed è espressa in W/m^2 o W/cm^2 . È un modo per misurare la potenza acustica, cioè la quantità di energia meccanica che il trasduttore trasmette ai tessuti biologici. Inoltre, l'intensità acustica in un punto del fascio US è direttamente proporzionale al quadrato della pressione acustica ($I = p^2/Z$), che rappresenta l'ampiezza dell'onda sonora.

I valori di intensità variano sia nel tempo che nello spazio del campo acustico. I parametri più utilizzati per misurare l'intensità sono i seguenti (Figura 10):

- I_{SP} (spatial peak): è il picco di intensità misurato sull'asse centrale del singolo emiciclo dell'onda.
- I_{SA} (spatial average): è l'intensità media temporale del fascio.

In caso di emissione pulsata, definito il PRF come la frequenza di ripetizione degli impulsi, l'intensità può essere calcolata come:

- I_{TP} (temporal peak): è il picco di intensità più elevato dell'impulso.

- I_{PA} (pulse average): è la media temporale dell'intensità durante tutta la durata dell'impulso.
- I_{TA} (temporal average): definisce l'intensità media temporale durante il periodo di tempo compreso tra due impulsi successivi (se l'emissione è continua, $I_{TA}=I_{PA}$).

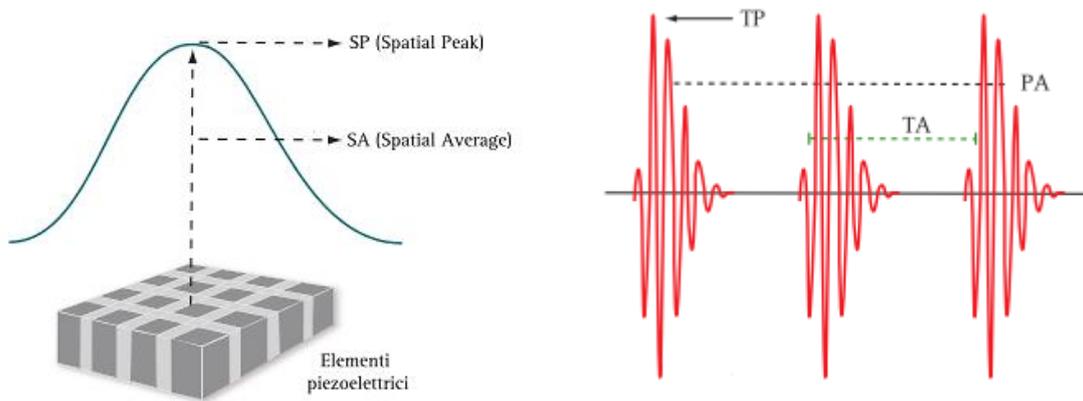


Figura 10: Misure di intensità acustica.

Generalmente l'intensità acustica è rappresentata tramite la combinazione dei parametri sopra descritti.

- I_{SATA} (spatial average temporal average): è il rapporto tra l'intensità media temporale (TA) e l'area della superficie del trasduttore.
- I_{SPTA} (spatial peak temporal average): è pari al prodotto di I_{SATA} per il rapporto tra I_{SP} e I_{SA} . È un indicatore degli effetti termici degli ultrasuoni.
- I_{SPPA} (spatial peak pulse time average): esprime l'intensità media massima del fascio US in qualsiasi istante.
- I_{SPTP} (spatial peak temporal peak): è il rapporto tra I_{SPTA} e il duty cycle (cioè la percentuale del periodo in cui il segnale è alto).

È stato stabilito che la propagazione delle onde sonore comporta un trasferimento di energia meccanica fra particelle adiacenti. A prescindere dalla sorgente, la legge di conservazione dell'energia impone che in ogni istante tutta l'energia generata da quella sorgente debba essere ritrovata, comprese le eventuali perdite, all'interno del sistema considerato. Si deve poter descrivere quanta energia fluisce nel tempo attraverso il sistema. Le grandezze fisiche che ci descrivono questo sono l'intensità di energia e la potenza. L'intensità sonora associata ad un'onda è definita come la quantità di energia che fluisce, nell'unità di tempo, attraverso una superficie di area unitaria perpendicolare alla direzione di propagazione dell'onda. L'unità di misura è il watt al metro quadrato. Per determinare l'intensità sonora, si pensi ad uno strato di particelle del mezzo affacciato alla

superficie di un'area unitaria, il quale, interessato dal passaggio della perturbazione, agisce su uno strato contiguo di particelle con una forza per unità di area p , la pressione sonora. Durante un intervallo di tempo dt , le particelle, sotto l'azione della forza, vengono spostate di $dx = udt$ ed il lavoro compiuto è uguale alla forza moltiplicata per tale spostamento. L'intensità sarà dunque il prodotto della pressione p per la velocità di particella u . Per un'onda piana progressiva sarà:

$$I = p \times u \cdot \cos^2 \left[\omega \left(t - \frac{x}{c} \right) \right] \quad 8.$$

Dove

p := pressione sonora

u := velocità di particella

c := velocità di propagazione nel mezzo

Di solito, la grandezza d'interesse è l'intensità media calcolata nell'intervallo corrispondente al periodo T dell'onda:

$$\hat{I} = \frac{1}{T} \int_0^T p \times u \cdot \cos^2 \left[\omega \left(t - \frac{x}{c} \right) \right] dt \quad 9.$$

Il cui risultato è semplicemente:

$$\hat{I} = \frac{1}{2} p \times u = p^2 \frac{1}{2 \cdot Z} \text{ W/cm}^2 \quad 10.$$

Essendo l'intensità sonora legata alla pressione acustica, anche per l'intensità si parlerà di attenuazione esponenziale, risulta:

$$I(x) = I(0) \cdot e^{-2\alpha \cdot x} \quad 11.$$

Il coefficiente di attenuazione α viene comunemente espresso in dB/m. Nelle applicazioni biomediche, è consuetudine specificare una serie di valori caratteristici che possono essere ricavati direttamente dalla forma d'onda rilevata da un idrofono, nella condizione più generale che il trasduttore operi in regime impulsivo. Sulla base della relazione che lega l'intensità acustica al quadrato della pressione acustica, attraverso l'impedenza caratteristica del mezzo, dai valori di pressione acustica possono essere definiti alcuni valori caratteristici dell'intensità:

- Picco temporale dell'intensità (Temporal-peak intensity) I_{tp} (W/m^2): determinato direttamente dal valore più grande di picco positivo o picco negativo dell'impulso.

- Integrale dell'intensità dell'impulso (pulse-intensity integral) I_{pi} : integrale nel tempo dell'intensità istantanea. È determinato direttamente dall'integrale del valore quadratico della pressione acustica

$$I_{pi} = \frac{p_i}{\rho_0 \cdot c} \quad 12.$$

Dove p_i è l'integrale del valore quadratico della pressione acustica.

- Intensità media dell'impulso (Pulse-average intensity) I_{pa} : Rapporto tra l'integrale dell'intensità e la durata dell'impulso

$$I_{pa} = \frac{I_{pi}}{t_d} \quad 13.$$

- I Intensità massima (Maximum intensity) I_m : valore medio dell'intensità calcolato sul semiperiodo con il picco temporale dell'intensità più elevato

$$I_m = \int_{\frac{1}{2}periodo}^{\frac{1}{2}periodo} \frac{I}{semiperiodo} dt \quad 14.$$

- Media temporale dell'intensità (Temporal-average intensity) I_{ta} : media temporale dell'intensità istantanea calcolata su un intero periodo prp di ripetizione dell'impulso

$$I_{ta} = \frac{I_{pi}}{prp} = prr \cdot I_{pi} \quad 15.$$

- prp [Hz]: Frequenza di ripetizione dell'impulso (numero di impulsi al secondo);
- prp [s]: Periodo di ripetizione dell'impulso;

Quest'ultime sono legate dalla relazione:

$$prp = 1/prr \quad 16.$$

Per alcune delle formulazioni dell'intensità acustica sopra riportate è importante specificare il massimo valore raggiunto all'interno del campo generato globalmente dal trasduttore, o su di un particolare piano normale all'asse di propagazione, attribuendo ad esso la definizione di massimo spaziale (Spatial-peak):

- Massimo spaziale del picco temporale dell'intensità (Spatial-peak tempo temporal-peak intensity) I_{sptp} (W/m^2).

- Massimo spaziale dell'intensità media dell'impulso (Spatial-peak pulse average intensity) I_{SPPA} (W/m^2).
- Massimo spaziale della media temporale dell'impulso (Spatial-peak temporal-average intensity) I_{SPTA} (W/m^2).

Infine, è usuale definire un valore medio spaziale della media temporale dell'intensità (Spatial-average temporal average intensity), I_{SATA} riferito all'area A del fascio di ultrasuoni generato:

$$I_{SATA} = \frac{\int_{area\ del\ fascio} I_{ta} dA}{\int_{area\ del\ fascio} A} \frac{W}{m^2} \quad 17.$$

dove per area del fascio si intende convenzionalmente quella della superficie, su un piano perpendicolare alla direzione di propagazione, comprendente tutti i punti in cui l'integrale del valore quadratico della pressione acustica (Pulse-pressure squared integral) p_i non è inferiore di 6 dB rispetto al valore massimo.

Da un punto di vista quantitativo vale la seguente relazione: $I_{SPTP} > I_{SPPA} > I_{SPTA} > I_{SATA}$.

Con riferimento agli ultrasuoni terapeutici di alta e bassa intensità, i valori di intensità acustica riportati in letteratura sono principalmente I_{SATA} e I_{SPTA} .

Per la *terapia ultrasonica ad alta intensità*, l'intervallo di intensità acustica riconosciuto da molti autori è:

$$I_{SATA} = 100 - 10000 \frac{W}{cm^2} \quad 18.$$

Le condizioni per operare *trattamenti terapeutici ad US a bassa intensità* non sono chiaramente definite in termini di intensità acustica. Diversi autori che hanno studiato questa famiglia di applicazioni hanno preferito attenersi ai limiti imposti dalla Food and Drug Administration (FDA) riguardo l'uso degli ultrasuoni:

$$I_{SPTA} < 0,72 \frac{W}{cm^2} \quad e \quad I_{SPPA} < 190 \frac{W}{cm^2} \quad 19.$$

I valori di I_{SATA} e I_{SPTA} trovati in letteratura per le applicazioni terapeutiche con US a bassa intensità sono riassunti nella tabella seguente (Tabella 3):

Tabella 3: Range di intensità acustica per la terapia ultrasonica a bassa intensità (studi in vitro).

	Emissione continua	Emissione pulsata
I_{SATA}	0,3 – 3 W/cm ²	0,007 – 0,1 W/cm ²
I_{SPTA}	3 – 17 W/cm ²	0,09 – 48 W/cm ²

1.5 EFFETTI FISICI DEGLI ULTRASUONI IN AMBITO MEDICO

L'effetto terapeutico ad alta intensità è generalmente ottenuto attraverso l'instaurarsi di un processo ipertermico, mentre i LIUS sono usati principalmente per produrre effetti non termici.

In generale, gli effetti degli US si definiscono non termici se comportano nel tessuto trattato un aumento trascurabile della temperatura ($\Delta T \leq 2^\circ\text{C}$).

Gli effetti termici, invece, si manifestano nel tessuto attraverso l'ipertermia, che può essere letale se comporta la morte irreversibile delle cellule attraverso necrosi istantanea, o sub letale se si riscontra un aumento della temperatura rispetto al valore fisiologico (37°C per gli umani) senza necrosi istantanea.

1.5.1 EFFETTI TERMICI

A causa delle vibrazioni fra le particelle di un mezzo sottoposto ad un campo di ultrasuoni, nel mezzo si verifica un fenomeno di assorbimento dell'energia acustica delle onde ultrasoniche che la trasforma in calore. È possibile stimare teoricamente questa quantità di calore tramite la seguente formula:

$$q_v = 2\beta I \quad 20.$$

dove β è il coefficiente di assorbimento ed I l'intensità acustica. La temperatura del mezzo quindi varierà secondo la legge:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{q_v}{\rho_0 c_p} \quad 21.$$

Dove C_p è il calore specifico del mezzo a pressione costante. Nella pratica la situazione è più complessa perché, ad esempio con trasduttori focalizzati, è difficile valutare l'intensità in uno specifico punto dello spazio. Inoltre, c'è da considerare che quando un materiale viene riscaldato il calore tende a trasferirsi verso regioni a temperatura inferiore per equilibrarla. Nei tessuti biologici, oltre ai fenomeni di trasferimento di calore per convezione, conduzione e radiazione, è presente un

fenomeno chiamato perfusione per il quale il calore viene ridistribuito attraverso i vasi sanguigni. Nel campo della diagnostica e terapia sono state sviluppate diverse formule semplificate per una stima della variazione della temperatura. Tali formule hanno dato luogo ai thermal index (TI) a seconda del tessuto interessato.

Per ottenere effetti termici, una delle tecniche più utilizzate è il trattamento HIFU (High Intensity Focused Ultrasound, $100 - 10000 \text{ W/cm}^2$) [2][3][4]. Si tratta di una tecnica di ablazione termica mininvasiva in grado di produrre una distruzione focalizzata del tessuto, utilizzata con successo in un'ampia varietà di tumori benigni e maligni (prostata, fegato, ossa e seno sono solo alcuni esempi di applicazione). L'obiettivo è di massimizzare l'accumulazione di energia nell'area bersaglio, inducendo reazioni biologiche (necrosi) senza danneggiare il tessuto circostante.

Se l'esposizione a HIFU è costante, la produzione di calore da parte degli ultrasuoni comporta la vibrazione delle molecole del tessuto ed è stato stimato che una temperatura maggiore di 56°C mantenuta per almeno 2 secondi induce necrosi cellulare. Questo trattamento produce lesioni e conseguenti risposte infiammatorie che innescano un processo di cicatrizzazione che può durare mesi. Se l'esposizione è pulsata, non si manifesta un effetto termico ma si induce nel tessuto il fenomeno della cavitazione acustica, cioè la formazione di cavità riempite di gas o liquido. Queste bolle, collassando, possono provocare la lacerazione meccanica delle membrane cellulari delle cellule, distruggendo il tessuto circostante (istotripsia).

Nonostante il trattamento HIFU si sia dimostrato efficiente in molti campi di applicazione, soprattutto per terapie antitumorali, ci sono alcune problematiche di cui bisogna tener conto, ad esempio:

- Controllare la temperatura (ad esempio, la tecnica HIFU è stata affiancata dalla risonanza magnetica per gestire il parametro "temperatura" [5] e sono stati progettati algoritmi al fine di migliorarne il controllo [6]).
- Evitare le bruciature cutanee con sistemi di raffreddamento.
- Preservare il tessuto circostante all'area bersaglio.
- Stimare le perdite di energia attraverso diversi strati di tessuto in funzione della profondità dell'area bersaglio.

1.5.2 EFFETTI MECCANICI

Per quanto riguarda gli ultrasuoni a bassa intensità, nonostante ci siano alcune applicazioni che sfruttano il loro effetto termico (ad esempio per la guarigione delle ferite o per la fisioterapia [7]), sono per lo più utilizzati per generare effetti non termici.

Una classificazione proposta da Tang e al. [8] divide gli effetti non termici in effetti sono-meccanici ed effetti sono-chimici (Figura 11).

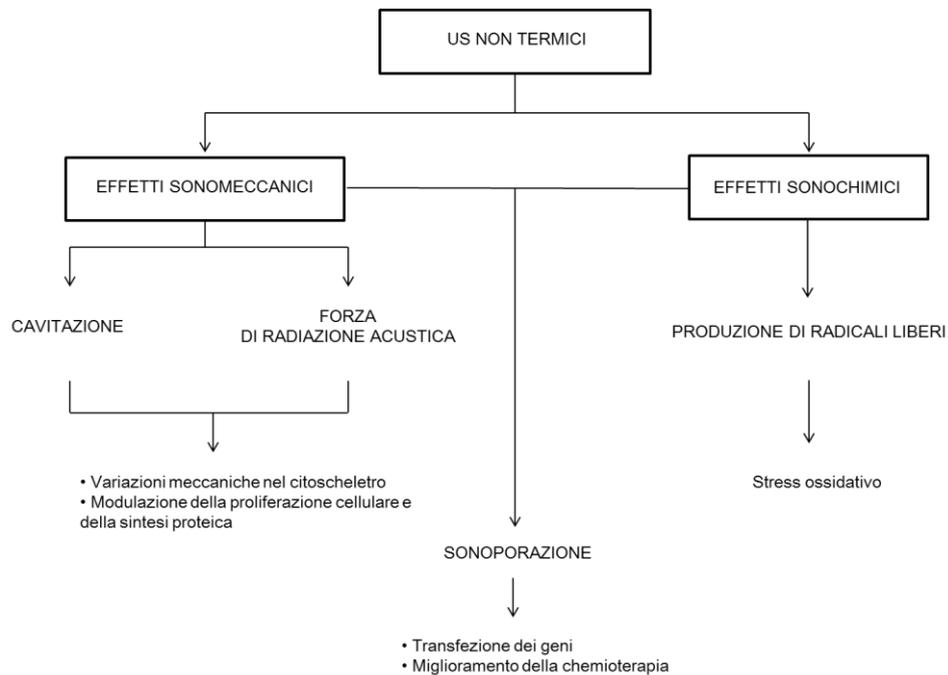


Figura 11: Classificazione degli effetti non termici.

Gli effetti sono-meccanici possono essere indotti da:

- *Cavitazione*: è un processo fisico derivato dall'interazione degli ultrasuoni con un liquido. Consiste nella formazione di cavità gassose, derivanti da nuclei cavitazionali presenti in soluzione, che possono oscillare (cavitazione stabile) o collassare (cavitazione inerziale) nel campo dell'onda a causa di cambiamenti del gradiente di pressione.
- *Forza di radiazione acustica*: nasce dall'interazione fisica tra l'onda acustica e l'oggetto con il quale interagisce. Tale forza influenza il macroambiente, in particolare la transfezione genica, la proliferazione cellulare, la sintesi delle proteine e la dinamica della membrana cellulare.

Gli effetti biologici derivati dagli effetti sono-meccanici sono:

- *Variazioni meccaniche del citoscheletro*: dovute all'esposizione a ultrasuoni a bassa intensità, consistono nella depolarizzazione e nel riassetto di actina e tubulina in strutture più frammentate rispetto alla normale disposizione nel citoscheletro. I filamenti intermedi sono meno sensibili agli ultrasuoni [9]. Queste variazioni possono essere reversibili o irreversibili. L'ultimo caso è utilizzato per il trattamento dei tumori, quando la ridistribuzione dei filamenti del citoscheletro diventa permanente perché affiancata dall'utilizzo di specifici farmaci al fine di aumentarne la potenza.
- *Modulazione della proliferazione cellulare e della sintesi proteica*: tale fenomeno è stato osservato ma non sono ancora del tutto chiari i meccanismi perché bisogna considerare diversi parametri, sia riguardanti gli ultrasuoni (ad esempio frequenza, duty-cycle, intensità) che le cellule (è stato dimostrato che le cellule malate sono più sensibili agli ultrasuoni rispetto alle cellule sane).

Gli effetti sono-chimici sono per lo più legati alla produzione di radicali liberi:

- *Extracellulari*: derivano da processi di cavitazione inerziale e possono provocare danni alla membrana plasmatica delle cellule.
- *Intracellulari*: vengono prodotti dai mitocondri e sono responsabili dell'innescamento di una cascata di reazioni fondamentali per il processo di apoptosi.

Gli effetti dei radicali liberi non sono completamente chiarificati in letteratura, infatti si trovano opinioni contrastanti a riguardo [1][7][8][9][10]. In generale essi, sono responsabili dell'insorgere di uno stato di *stress ossidativo* dovuto alla rottura dell'equilibrio fisiologico tra la loro produzione e la loro eliminazione.

Dalla combinazione dei meccanismi sono-chimici e sono-meccanici deriva, infine, un'altra categoria di effetti legati al processo di *sono-porazione*, cioè la formazione di pori sulla membrana plasmatica delle cellule, la cui dimensione dipende dalla pressione acustica e dal duty-cycle degli ultrasuoni utilizzati. Anche questo processo può essere reversibile, quando è concessa l'apertura e la richiusura dei pori, o irreversibile se porta a morte cellulare per necrosi. La sono-porazione è utilizzata sia favorire per la transfezione genica sia per migliorare il processo di drug-delivery chemioterapeutico.

1.6 APPLICAZIONI DEGLI US A BASSA INTENSITÀ

Gli ultrasuoni a bassa intensità trovano molti campi di applicazione in ambito clinico [7][11].

Uno degli aspetti più interessanti riguarda la terapia antitumorale. Come accennato precedentemente, è stato dimostrato che le cellule malate sono più sensibili all'esposizione degli ultrasuoni rispetto alle cellule sane. Lejbkowicz' e Salzberg [12] hanno esposto cellule sane e cellule malate alle stesse condizioni di esposizione a US (onda continua, 20 kHz, 0,33 W/cm², per un tempo massimo di 4 minuti). A valle dell'esposizione è stato valutato il numero di cellule ancora in vita, il tasso di sintesi di DNA e proteine e l'abilità delle cellule di moltiplicarsi. La maggiore sensibilità delle cellule malate potrebbe essere dovuta alle specifiche proprietà morfofisiologiche e alla maggior rigidità della membrana plasmatica. Il trattamento US a bassa intensità, a differenza del trattamento ad alta intensità, può quindi interagire solo con le cellule tumorali preservando le cellule sane.

Un possibile approccio alla lotta contro il tumore è quello di pensare che per bloccare l'espansione delle cellule tumorali si possono seguire due strade:

- Indurre l'apoptosi delle cellule tumorali
- Inibire la proliferazione delle cellule tumorali

1.7 L' APOPTOSI CELLULARE

Con il termine apoptosi si fa riferimento al processo di morte programmata attraverso il quale vengono eliminate cellule indesiderate e/o con danni irreversibili, al fine di mantenere l'omeostasi dei tessuti.

Si differenzia dalla necrosi, che consiste nella morte cellulare provocata da forme di danno acuto in condizioni ambientali avverse con conseguenti alterazioni delle cellule circostanti, infiammazione e risposta immunitaria.

Il processo di apoptosi è generalmente indotto da particolari stimoli fisiologici, che a loro volta attivano percorsi biochimici articolati. Nella cascata di reazioni che conducono al "suicidio" della cellula, i mitocondri giocano un ruolo fondamentale per l'attivazione degli enzimi caspasi, protagonisti della biochimica dell'apoptosi [13].

Dal punto di vista morfologico, si possono individuare diverse fasi che costituiscono il processo apoptotico [14]: inizialmente si manifesta una condensazione del nucleo e del citoplasma della cellula, con conseguente deformazione della membrana plasmatica e formazione di protuberanze. Il processo continua con il distacco di queste protuberanze e la formazione di corpi apoptotici compatti

e di dimensioni variabili, il cui contenuto dipende dalla componente citoplasmatica che li ha generati. Tali corpi possono essere fagocitati dalle altre cellule e possono essere degradati al loro interno.

L'apoptosi può essere sfruttata nelle terapie di regressione tumorale e può essere indotta dall'esposizione a ultrasuoni a bassa intensità.

È stato osservato [9] [15] che l'esposizione a ultrasuoni a bassa intensità fa sì che la membrana plasmatica delle cellule esposte si comporta come un oscillatore meccanico e come fonte di cavitazione intracellulare. Infatti, lo spazio tra i due strati fosfolipidici della membrana plasmatica si gonfia e si sgonfia con una certa frequenza: poiché la pressione acustica ha un comportamento oscillatorio, i due strati si allontanano nella fase di pressione negativa e si avvicinano nella fase di pressione positiva. Questi movimenti della membrana portano a una progressiva repressione fisica dei componenti citostrutturali, seguita dal recupero della morfologia iniziale a valle dell'esposizione in caso di modifiche reversibili. Tra gli elementi del citoplasma, è il citoscheletro ad essere particolarmente stimolato con cicli di contrazione e rilascio che possono attivare proteine meccanicamente sensibili. Tali proteine attivate possono, per esempio, contribuire ad aumentare la permeabilità della membrana, cambiandone il potenziale (effetti biomolecolari [16]), e in generale possono amplificare gli effetti biologici.

Il comportamento da oscillatore meccanico produce dei danni sulla membrana plasmatica: le cellule in grado di "riparare il danno" possono sopravvivere; le altre innescano processi di frammentazione del DNA che conducono a morte per apoptosi.

L'apoptosi dipende da diversi fattori, alcuni dei quali riguardano le caratteristiche degli ultrasuoni a cui le cellule sono sottoposte.

Ad esempio, la *frequenza* è un parametro determinante: il suo valore ottimale per indurre danni alla membrana dipende dalla geometria e dalle proprietà meccaniche di quest'ultima.

È stato osservato [15] che l'esposizione a US con variazioni di frequenza ha una maggiore probabilità di interferire con le cellule in termini di morte cellulare rispetto all'esposizione a US di frequenza costante. In particolare, esporre le cellule a US con frequenze decrescenti sembra essere più efficace, tanto che nello studio citato sono state individuate le seguenti condizioni ottimali per la sonicazione di cellule appartenenti ad una linea di leucemia: frequenza decrescente da 640 kHz a 400 kHz, Burst Rate pari a 10 Hz, intensità acustica 90 mW/cm^2 per una durata di esposizione pari a 180 s.

L'effetto della frequenza degli ultrasuoni a bassa intensità è stato studiato anche da Louw e al. [17], che hanno costruito un modello matematico per prevedere sforzi e deformazioni nella cellula. I loro risultati riportano che la posizione della cellula nel campo dell'onda stazionaria è un fattore critico (la stimolazione cellulare varia tra nodi e antinodi) e che alla *frequenza di risonanza* sforzi e

deformazioni sulla cellula sono massimi. I parametri da cui dipende la frequenza di risonanza sono i seguenti:

- Dimensioni della cellula, che a loro volta dipendono dalla tipologia di cellula e dalla fase del ciclo cellulare in cui si trova
- Porosità della cellula
- Modulo di massa, caratterizzato da grande variabilità a causa dell'elevata eterogeneità meccanica intracellulare, che comporta un differente grado di compressibilità. Ad esempio, il modulo di massa dei microtubuli può variare tra 1 MPa e 10 GPa.

Alla frequenza di risonanza, inoltre, si massimizza l'effetto di amplificazione che ogni membrana plasmatica vibrante ha nei confronti delle cellule vicine [18].

Oltre alla frequenza, l'apoptosi dipende anche dall'*intensità* degli US. All'intensità minore possibile alla quale viene osservata morte cellulare, il rapporto apoptosi/lisi è elevato, ma aumentando l'intensità il rapporto tende a diminuire. Tuttavia, se intensità più elevate sono affiancate da una modulazione pulsata con maggiore periodo di pausa, non solo aumentano i danni alla membrana ma le si concede anche un tempo maggiore per ripararsi, in modo che resti intatta fino a che non venga attivata la frammentazione del DNA. È bene osservare che necrosi e apoptosi indotta da US sono due eventi strettamente collegati: la necrosi cresce in modo proporzionale all'apoptosi e aumenta all'aumentare dei tempi di esposizione [19] (Figura 12).

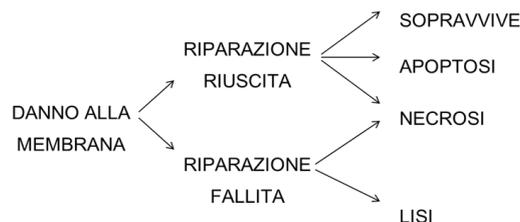


Figura 12: Comportamento della cellula in funzione della riparazione del danno alla membrana.

L'apoptosi indotta da US dipende anche da altri fattori che non riguardano i parametri d'onda, tra i quali:

- La *concentrazione di anidride carbonica*. Al suo aumento, diminuisce l'energia della cavitazione con conseguente riduzione degli effetti chimici e biologici. In letteratura è riportato che una concentrazione di anidride carbonica pari a 20mM comporta l'inibizione totale degli effetti [19].

- Utilizzo di *agenti di eco-contrasto (ECA)*. Questi agenti si trovano in commercio sotto forma di micro-bolle che, interagendo con l'esposizione a US, collassano e i frammenti derivati costituiscono nuclei cavitazionali secondari (cavitazione extracellulare). Questi nuclei secondari possono introdursi nelle cellule grazie ai pori sulla loro membrana e intensificare così il processo di cavitazione intracellulare.

1.7.1 LA PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE TUMORALI

Le cellule tumorali, a differenza delle cellule sane, si caratterizzano per la capacità di sostenere una proliferazione incontrollata. In seguito a mutazioni geniche, i meccanismi di controllo del ciclo cellulare risultano alterati e tali modifiche comportano un aumento della frequenza del processo di mitosi. Un ulteriore contributo all'elevato tasso di proliferazione è costituito dalla perdita parziale o totale da parte delle cellule tumorali della capacità di subire l'inibizione di contatto [20].

L'inibizione di contatto si verifica quando un vincolo meccanico fa sì che le successive divisioni cellulari riducano l'area a disposizione delle cellule fino al completo arresto della mitosi quando l'area raggiunge un valore critico. È stato osservato in colture cellulari in vitro che inizialmente le cellule affrontano una fase di *crescita libera* a densità costante, in cui sono sottoposte a uno stress di trazione. Nella successiva fase di *pre-transizione* si verifica il rilascio della trazione e un iniziale aumento di densità (riduzione dello spazio a disposizione); le cellule si duplicano, ma non riescono a raggiungere le dimensioni delle cellule madri. Nella fase di *post-transizione*, le cellule all'interno del volume della coltura sono sottoposte a uno stress di compressione e la mitosi si arresta completamente. Quindi il processo di mitosi è controllato meccanicamente e in particolare uno stato tensionale di compressione potrebbe essere interpretato come segnale inibitorio della mitosi.

Gli US possono frenare la proliferazione delle cellule tumorali tramite meccanismi diversi.

Diversi studi effettuati su linee di cellule tumorali [1][10][15] hanno riportato che l'esposizione a US di bassa intensità induce danni al DNA. Tali danni possono inibire la duplicazione dello stesso DNA e di conseguenza ridurre drasticamente il tasso di proliferazione cellulare. Questi risultati confermano che gli US a bassa intensità possono essere una buona promessa nella terapia del cancro.

Riferendosi alle cellule tumorali, si parla di "paradosso della rigidità" [21] per indicare che mentre la massa tumorale globalmente risulta più rigida del tessuto sano a lei circostante, le singole cellule tumorali possono essere più soft delle cellule sane. Questo paradosso si risolve distinguendo una fase primaria, in cui le cellule tumorali devono avere elevata flessibilità e deformabilità per espandersi, da una fase secondaria, in cui si registra un aumento della rigidità dovuta all'aumento della componente

stromale quindi strutturale della massa tumorale. La minore rigidità delle cellule tumorali si spiega osservando i cambiamenti nel loro citoscheletro, in particolare la distribuzione dell'actina, che risulta frammentata in piccoli segmenti in una configurazione meno organizzata e meno densa rispetto alla configurazione delle cellule sane.

Alla luce delle ultime osservazioni, si può affermare che il potenziale metastatico delle cellule tumorali, definito in termini di proprietà migratorie e invasive, è inversamente proporzionale alla rigidità: le cellule tumorali soft sono maggiormente invasive (Tabella 4). Quindi la rigidità diventa un biomarker per valutare il potenziale metastatico delle cellule tumorali [22]. Poiché è stato osservato che l'esposizione a US a bassa intensità è in grado di determinare un aumento della rigidità di alcune cellule tumorali, tale aumento può contribuire a ridurre la capacità di invasione di alcune cellule tumorali, contribuendo all'inibizione della loro proliferazione [10].

	MODULO ELASTICO (kPa)
Cellule sane (IOSE)	$2,472 \pm 2,048$
Cellule tumorali, meno invasive (HEY)	$0,884 \pm 0,529$
Cellule tumorali, maggiormente invasive (HEY A8)	$0,494 \pm 0,222$

Tabella 4: Moduli elastici di linee cellulari di tumore alle ovaie [23]

1.8 METODI DI SPERIMENTAZIONE IN LETTERATURA

Gli effetti degli ultrasuoni a bassa intensità sono stati studiati per lo più in cellule isolate, sospensioni cellulari e colture in vitro. Le condizioni sperimentali utilizzate negli studi sono molto diverse in termini di tipologia d'onda (pulsata o continua), tempi di esposizione al trattamento (secondi, minuti ed ore), frequenze e intensità acustiche degli US, tipologia della sonda (a immersione o meno).

I risultati così ottenuti non includono una serie di variabili biologiche presenti nell'organismo, tuttavia consentono una migliore comprensione dei cambiamenti fisiologici indotti dall'esposizione ad ultrasuoni.

Ivone e Pappalettere [23] ad esempio hanno relazionato la natura delle cellule in coltura alla sensibilità ai parametri degli US valutando gli effetti di mortalità. Hanno riportato i seguenti risultati:

- Per le *cellule aderenti*, cioè cellule che fanno parte di tessuti solidi e crescono aderendo alla superficie di coltura, il tasso di mortalità è maggiormente sensibile alla frequenza degli US. Infatti, poiché i vincoli cinematici impediscono alle cellule di essere indipendenti, risulta più semplice far vibrare l'intero sistema lungo una direzione preferenziale, causando l'aumento di mortalità per risonanza.
- Le *cellule in sospensione* crescono normalmente in un mezzo fluido senza aderire alla superficie di coltura. In queste colture, la soluzione assorbe la potenza del fascio ultrasonico e la restituisce alle cellule. In questo modo il tasso di mortalità è più sensibile dall'intensità degli US piuttosto che alla loro frequenza.

Tuttavia, una microregione tumorale è costituita da cellule malate organizzate in una struttura tridimensionale che interagiscono con l'ambiente circostante. Il comportamento delle cellule tumorali è fortemente influenzato dalle interazioni con il microambiente, in particolare con la matrice extracellulare e con altre cellule tra cui fibroblasti, cellule endoteliali e cellule del sistema immunitario ma questo aspetto verrà approfondito nel capitolo dedicato. Queste interazioni possono essere sia di tipo biochimico (ad esempio, la resistenza ai farmaci può dipendere anche dall'ambiente circostante) che meccanico. Infatti, lo stato tensionale a cui sono soggette le cellule tumorali condiziona crescita, proliferazione, migrazione e apoptosi.

1.8.1 TEST SPERIMENTALI: ATTENUAZIONE US SU TESSUTO EX-VIVO

Come già anticipato all'inizio del capitolo è stata condotta una prima sessione sperimentale per prendere confidenza con gli Ultrasuoni e le difficoltà legate all'analisi dei segnali, sono stati condotti quindi dei primi test per caratterizzare l'attenuazione degli US attraverso di due tipologie di tessuto biologico già note in letteratura: tessuto muscolare scheletrico e tessuto epatico.

Il tessuto muscolare scheletrico è un tessuto soft e, come tale, può essere considerato incompressibile perché il modulo di massa è notevolmente maggiore del modulo di taglio, mentre il modulo di Poisson è approssimato a 0,5 e il modulo elastico a 20 kPa [28]. I valori di impedenza acustica e velocità del suono attraverso questa tipologia di tessuto sono indicati nella Tabella 1. La scelta del tessuto muscolare è stata effettuata perché, immaginando di dover applicare un trattamento ad US antitumorale transcutaneo (con la sonda a contatto con la pelle del paziente), il tessuto muscolare è compreso tra i tessuti che gli ultrasuoni devono attraversare, insieme a cute e grasso, a prescindere dall'obiettivo specifico del trattamento.

Per le prove sperimentali, è stato utilizzato un taglio di carré di maiale disossato, dal quale sono stati tagliati 5 tagli di spessore diverso (10, 20, 30, 40 e 50 mm) per valutare l'attenuazione del segnale in funzione della profondità. Poiché si tratta di un tessuto anisotropo, durante le prove si è posta attenzione a disporre i tagli in modo tale che le fibre potessero essere sempre orientate nella stessa direzione rispetto alla direzione di generazione del fascio di US.

Il tessuto epatico, a differenza del tessuto muscolare, è un tessuto isotropo, caratterizzato da una elevata riproducibilità delle misure elastografiche. Il modulo elastico di questa tipologia di tessuto dipende da molti fattori (come pressione sanguigna e omogeneità del tessuto), ma è generalmente compreso tra 4 kPa e 6 kPa [29]. La velocità del suono attraverso il tessuto epatico è stimata a 1570 m/s e l'impedenza acustica essere considerata pari a $1570 \times 10^3 \text{ kg/m}^2\text{s}$. La scelta di questo tessuto, a differenza del precedente, è stata fatta per avere un esempio più specifico di applicazione laparotomica sempre in nell'ambito di trattamento antitumorale a US.

Per le prove sperimentali è stato utilizzato del fegato di vitello a fette. Sono state effettuate prove su 5 spessori diversi (10, 20, 30, 40, 50 mm).

Poiché la temperatura è un fattore che incide molto sia sulle condizioni dei tessuti che sull'attenuazione degli ultrasuoni attraverso di essi, tutte le prove sono state condotte a temperatura ambiente (23 - 24 °C) e con tessuto ben idratato.

Il setup sperimentale per questi test è composto da varie componenti, in particolare è stato usato un oscilloscopio digitale con capacità di generare forme d'onda (Digital Storage Oscilloscope DSO4102C – Hantec) (Figure 13-14). La frequenza massima che l'oscilloscopio può leggere è 100 MHz (1GSa/s), il generatore può generare forma d'onda fino a 25 MHz (200MSa/s).

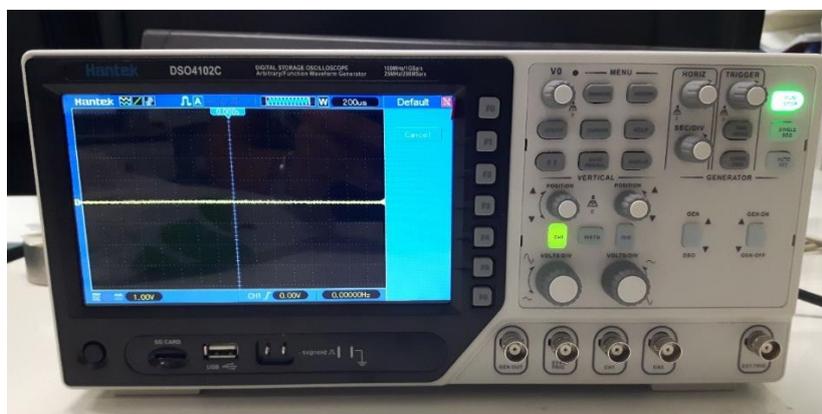


Figura 13: Oscilloscopio digitale, schermata di accensione

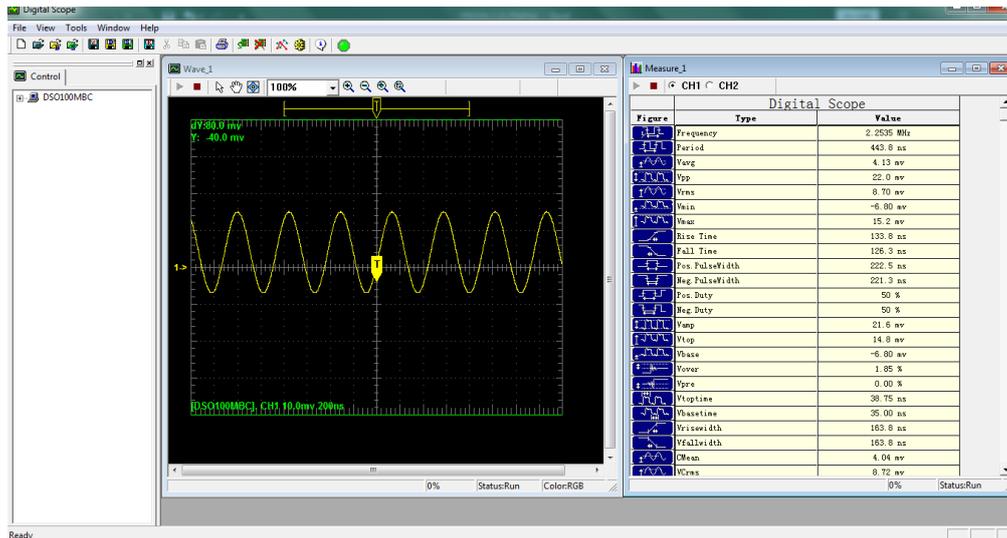


Figura 14 Interfaccia del software Digital Scope durante una prova con sonde a 2,25 MHz.

Le onde generate e le onde ricevute vengono poi acquisite real time sul PC ed elaborate direttamente dal software dedicato.

Sono stati utilizzati trasduttori piezoelettrici monocristallo, piane e con emissione di onde longitudinali (Figura 15). Le onde longitudinali, a differenza delle onde trasversali, sono meno attenuate dai tessuti biologici e hanno maggiore velocità di propagazione attraverso di essi [30]. Le misure sono state effettuate per trasmissione per sfruttare il vantaggio di questa tecnica di garantire maggiore penetrazione rispetto alla tecnica per riflessione, in quanto il fascio US deve attraversare il materiale una sola volta. Tale tecnica, infatti, è particolarmente adatta per provini ad alta attenuazione e di grande spessore. Sono state utilizzate 3 coppie di sonde, rispettivamente da 2,25 MHz, 5 MHz e 10 MHz, aventi cristalli piezoelettrici delle stesse dimensioni (Panametrics – NDT) (Figura 15).

Conoscendo il diametro dell'elemento piezoelettrico e la velocità del suono attraverso i tessuti, è stato possibile calcolare la lunghezza del campo vicino (NF) per le 3 sonde alle 3 frequenze diverse. I risultati sono riportati nella seguente tabella (Tabella 5).

	TESSUTO MUSCOLARE (v = 1585 m/s)		TESSUTO EPATICO (v = 1570 m/s)	
FREQUENZA	λ	NF	λ	NF
[MHz]	[mm]	[mm]	[mm]	[mm]
2,25	0,704	12,78	0,698	12,90
5	0,317	28,39	0,314	28,66
10	0,159	56,78	0,157	57,32

Tabella 5: Campo vicino delle sonde, in funzione del diametro del cristallo e della lunghezza d'onda.

Nominal Element Size		Frequency	Transducer Part Numbers		
inches	mm	MHz	ACCUSCAN-S	CENTRASCAN	VIDEOSCAN
0.25	6	2.25	A542S-SM	C542-SM	V542-SM
		3.5	A546S-SM	C546-SM	V546-SM
		5.0	A543S-SM	C543-SM	V543-SM
		10	A544S-SM	C544-SM	V544-SM

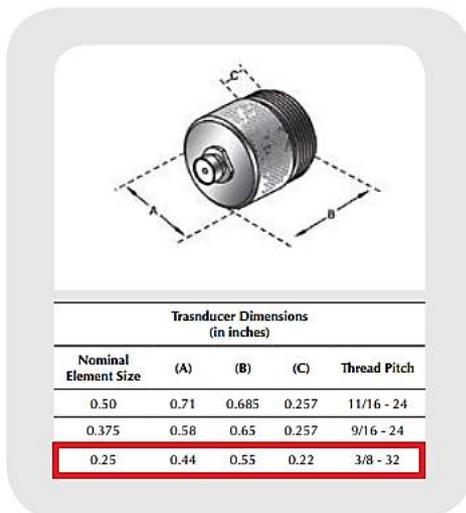


Figura 15: Sonde utilizzate per le prove, da catalogo. A sinistra, la tabella riassume le caratteristiche delle sonde e ne indica il modello. La tipologia "VIDEOSCAN" è adatta per test che richiedono un miglior rapporto segnale / rumore nei materiali attenuanti. A destra, parametri geometrici delle sonde. Fonte: Catalogo Panametrics – NDT .

Infine per realizzare le prove in modalità di trasmissione, è stato realizzato per produzione additiva, una piattaforma di supporto (Figura 16). Le esigenze che ne hanno determinato la realizzazione sono le seguenti:

- Mantenere fissa la posizione delle sonde e garantire la perpendicolarità del fascio ultrasonico attraverso il tessuto per ottimizzare la tecnica ultrasonica per trasmissione;
- Mantenere costante lo spessore del tessuto durante le prove, evitando di applicare qualsiasi tipo di carico esterno per non compromettere i risultati;
- Ottenere una buona ripetibilità delle misure.

Tale supporto è stato progettato attraverso il software di progettazione tridimensionale SolidWorks ed è stato poi realizzato in polipropilene attraverso una stampa 3D (Bjet 30 Pro, Stratasys)

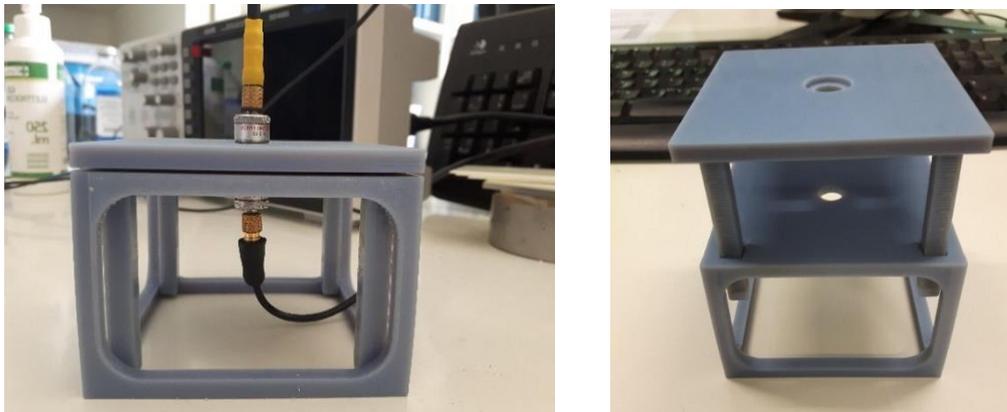


Figura 1: Supporto per le prove. A sinistra, base inferiore e base superiore. A destra, assieme delle due basi.

È costituito da due basi: una base inferiore e una superiore. Ciascuna base è dotata di un foro passante all'interno del quale è stata realizzata di stampo la filettatura complementare a quelle delle sonde; sono previste delle battute per la registrazione rapida durante il cambio sonde in quanto tutte della stessa famiglia con le stesse caratteristiche geometriche. La *base inferiore* rialzata garantisce lo spazio necessario per i cavi coassiali evitandone torsioni o piegature eccessive. Sulla superficie superiore sono presenti 4 fori quadrati smussati per permettere l'inserimento della base superiore. La *base superiore* è costituita da 4 steli di sezione quadrata, raccordati alla sua superficie inferiore, sui quali è stata ricavata una scala millimetrica per consentire una misura dello spessore del tessuto durante il test e permette di evitare disallineamenti tra le sonde. Gli steli vengono rivestiti di un film sottile di lubrificante per agevolare lo scorrimento nelle sedi.

Per effettuare le prove sui tessuti, i cristalli piezoelettrici delle sonde sono stati eccitati attraverso la generazione di onde sinusoidali continue. Tutte le prove sui tessuti sono state effettuate variando l'ampiezza massima tra 100 mV e 1 V a intervalli di 100 mV, e tra 1 V e il valore massimo di tensione consentito dallo strumento, ovvero 3,5 V, con intervalli di 500mV. I parametri scelti attraverso il tasto "AQUIRE" del generatore per l'acquisizione del segnale sono i seguenti: acquisizione in tempo reale (Real Time), modalità "Average" (128 punti), 4 K campioni.

A questo punto, con il tasto GEN ON è stata attivata la generazione dell'onda con i parametri precedentemente impostati. Collegato il generatore al PC tramite cavo USB, è stato possibile acquisire le immagini dell'oscilloscopio dal computer, avviando il software Digital Scope. (Figura 17)

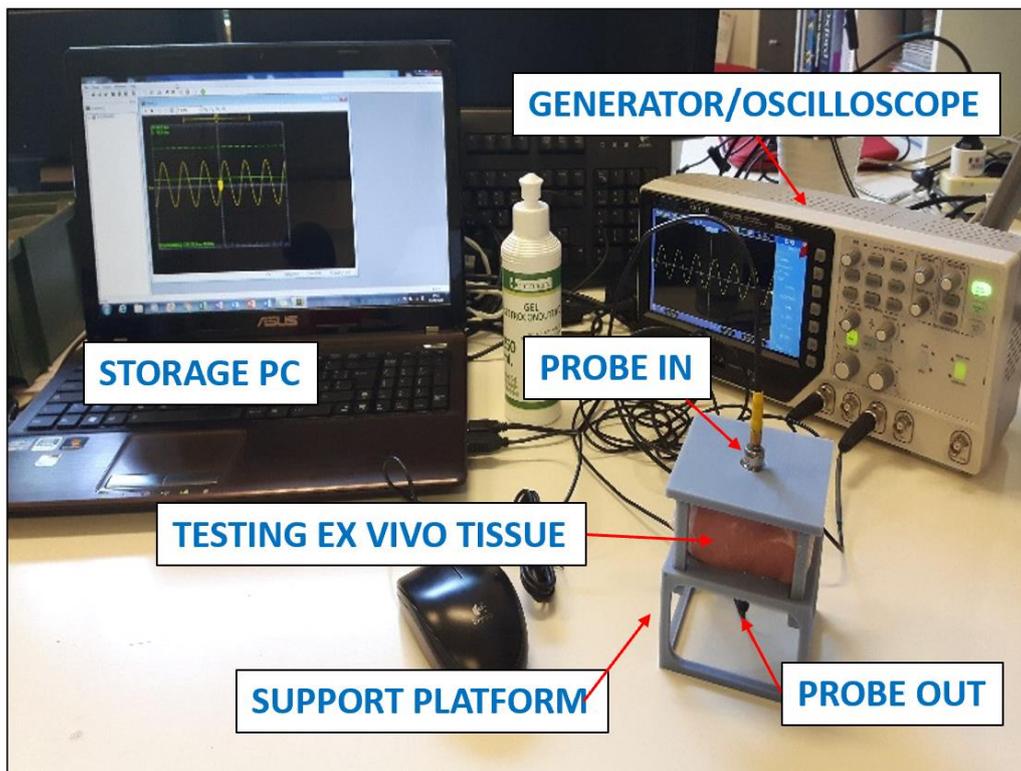


Figura 2: Setup sperimentale completo durante lo svolgimento di una prova su tessuto muscolare.

Impostato il setup, le prove sono state svolte interponendo tra le due basi del supporto il tessuto di spessori diversi. L'accoppiamento tra sonde e tessuto è stato garantito dal gel conduttivo.

1.8.2 RISULTATI SPERIMENTALI

I risultati ottenuti dalle prove sperimentali su tessuto muscolare e tessuto epatico sono riassunti nella tabella e nei grafici seguenti. (Tabella 6, Figura 18). Come ci si aspettava si ha una dispersione di energia maggiore all'aumentare della frequenza ed i dati ottenuti sono in linea con quanto presente in letteratura.[31]

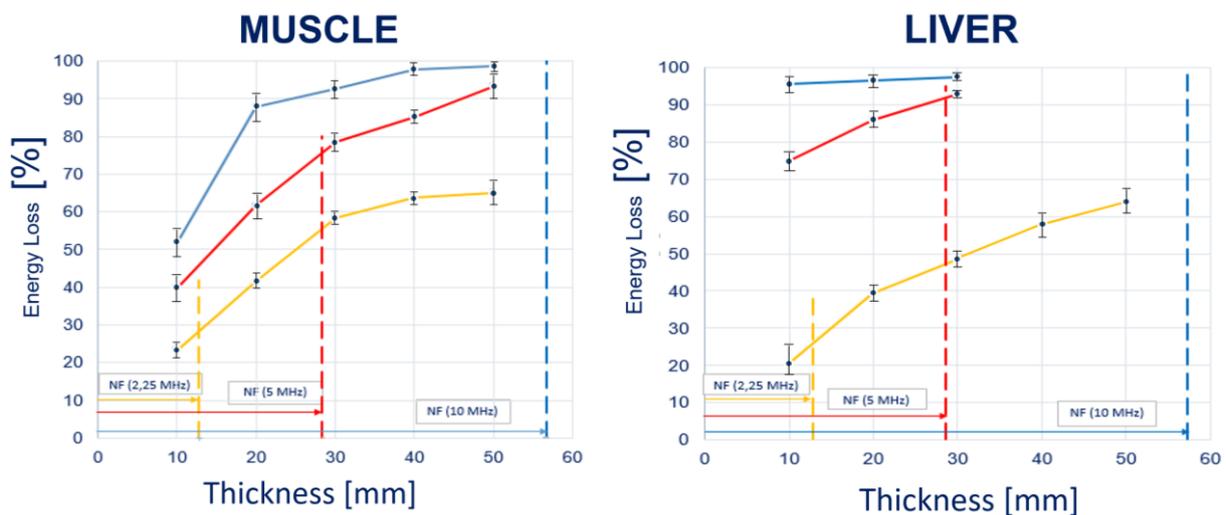


Figura 18: Attenuazione del segnale nel tessuto muscolare e nel tessuto epatico. Le rette verticali indicano il confine tra campo vicino e campo lontano delle sonde.

	MUSCLE			LIVER		
THICKNESS	2,25 MHz	5 MHz	10 MHz	2,25 MHz	5 MHz	10 MHz
[mm]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
10	23	40	53	20	75	95
20	42	62	88	38	86	97
30	58	78	94	48	99	99
40	64	85	98	57	/	/
50	68	93	99	64	/	/
dB/cm	2.3 ± 0.2	4.3 ± 0.6	9.2 ± 0.8	1.9 ± 0.1	11 ± 0.8	18 ± 1

Tabella 6: Percentuale di attenuazione del segnale nel tessuto muscolare ed epatico.

Una prima considerazione riguarda la consistenza dei tessuti: mentre il tessuto muscolare è maggiormente compatto e idoneo per questo tipo di prove, il tessuto epatico è molto più poroso, attraversato da vasi sanguigni, con la tendenza a rilasciare i liquidi in tempi piuttosto brevi perdendo la compattezza del taglio iniziale. In generale, i tessuti biologici sono mezzi di propagazione molto eterogenei: la presenza di cavità interne, residui di grasso e vasi sanguigni può alterare notevolmente

la valutazione dell'attenuazione del segnale. Per questo motivo ogni valore riportato nella Tabella 6 è il risultato di una valutazione statistica su 10 misurazioni effettuate sullo stesso spessore di tessuto alla stessa frequenza, variando solo la posizione della sonda sul tessuto.

L'attenuazione del segnale attraverso i tessuti è stata valutata in funzione di due parametri: spessore del tessuto e frequenza delle sonde, a temperatura ambiente costante. Come si può notare dai grafici, l'attenuazione del segnale aumenta al crescere dello spessore del tessuto lungo le curve di isofrequenza.

Nella maggior parte dei casi, il tessuto ha occupato il campo vicino delle sonde (la prova a 10 mm per le sonde a 2,25 MHz, le prove a 10 mm e 20 mm per le sonde a 5 MHz, tutte le prove per le sonde a 10 MHz): in questa zona, il segnale è caratterizzato da maggiore turbolenza rispetto al campo lontano. Tuttavia, questo effetto è stato mitigato con la funzione "Average" impostata nell'acquisizione dell'oscilloscopio.

Altri autori [31] hanno utilizzato un setup diverso per poter misurare i parametri acustici degli ultrasuoni emessi da un trasduttore: al fine di valutare i parametri US a bassa intensità ottimali per massimizzare la proliferazione e la differenziazione di cellule muscolari, la loro strumentazione comprendeva l'utilizzo di sonde a immersione e di un idrofono per determinare la geometria del campo acustico generato dal trasduttore. L'idrofono è un trasduttore piezoelettrico che traduce in energia elettrica l'energia meccanica derivante da una variazione di pressione, ed è stato utilizzato in acqua per misurare la pressione acustica degli US emessi dalla sonda. Note la pressione acustica, la densità dell'acqua e la velocità del suono in acqua, si è potuto determinare l'intensità acustica. I risultati sono coerenti con le previsioni: a temperatura costante, l'attenuazione del segnale aumenta all'aumentare dello spessore del tessuto e della frequenza delle sonde.

Questa prima fase sperimentale è stata essenziale per individuare le criticità di un trattamento sperimentale ad US a bassa intensità: preparazione del campione da portare lentamente a temperatura ambiente facendo attenzione a mantenerlo idratato, smontaggio e rimontaggio sonde, registrazione della posizione piattaforma, correzione parallelismo, stesura ottimale gel di accoppiamento, calibrazione ed acquisizione del segnale. Questa esperienza ha permesso di conoscere ed ridurre le criticità appena elencate nella progettazione e realizzazione del setup sperimentale ad immersione per la stimolazione ad US specifico per sferoidi cellulari, che sarà ampiamente trattato nel capitolo dedicato.

CAPITOLO 2

MEDOTOLOGIE DI INDAGINE E CARATTERIZZAZIONE DI SFEROIDI TUMORALI PANCREATICI

In questo capitolo verranno delineati gli aspetti principali connessi alle proprietà meccaniche dei soft tissues ed alle metodologie di indagine più idonee alla loro caratterizzazione. Nello specifico vengono messi a confronto i risultati di indagini microscopiche sperimentali su Sferoidi PANC-1 al fine di estrapolarne le caratteristiche meccaniche da usare successivamente nella simulazione agli elementi finiti.

2.1 IMPORTANZA DELLE PROPRIETÀ MECCANICHE SUL COMPORTAMENTO CELLULARE

Comunemente, il controllo del destino cellulare è stato attribuito a fattori modulanti, come fattori di crescita e citochine, anche se studi recenti hanno dimostrato che il comportamento cellulare è regolato principalmente dall'ambiente in cui le cellule vengono coltivate in vivo o in vitro. Questo ambiente solido è solitamente rappresentato dalla matrice extracellulare naturale in vivo e da ECM artificiale o scaffold in biomateriali. La maggior parte delle cellule è incorporata in questa rete fibrosa e complessa composta da proteine e polisaccaridi, come collagene, fibronectina, laminina, che forniscono le proprietà necessarie per il corretto funzionamento di ciascun tessuto e facilitano le interazioni cellula-cellula e le interazioni cellula-ECM. [32]

Il controllo basato sull'ECM può influenzare il destino delle cellule staminali attraverso molteplici meccanismi, come la geometria e l'architettura dell'ECM, la micro e nanoscala, le proprietà meccaniche dell'ECM come l'elasticità e la rigidità, la trasmissione meccanica del segnale e le interazioni cellulari. [33]

È stato dimostrato che la rigidità del substrato può modulare il comportamento delle cellule: nei tessuti molli l'ECM è sotto tensione, perché tutte le cellule circostanti esercitano forze di trazione durante la loro adesione all'ECM. A causa di questo tensionamento dei tessuti, le sollecitazioni si diffonderanno in modo diverso nelle diverse regioni; infatti la membrana basale, a causa della sua sottigliezza, si allungherà più delle parti circostanti della matrice extracellulare. Questa disomogeneità provocherà una trasmissione non omogenea delle forze applicate ai recettori di superficie, che mediano l'interazione tra l'ambiente esterno e quello interno. A causa di questa eterogeneità che comprende la distorsione cellulare del citoscheletro, ci sarà un'alterazione nelle attività cellulari, come la trasmissione del segnale e le funzioni di regolazione. [34]

In questo modo, le cellule distorte attiveranno modelli specifici che stimolano la proliferazione e la crescita, mentre le cellule nelle regioni vicine che non stanno subendo effetti di distorsione stimolerebbero la segnalazione intracellulare che promuove la quiescenza nello stesso ambiente ristretto. [34]

Il processo attraverso il quale le cellule convertono uno stimolo meccanico dell'ambiente circostante in uno stimolo biochimico è chiamato mecano-trasduzione. Questi segnali, come già accennato, possono alterare e influenzare il comportamento cellulare e lo sviluppo dei tessuti. Il processo di

meccano-trasduzione può essere suddiviso in più fasi, che portano alla conversione e trasmissione dei segnali. Il primo passo - accoppiamento meccanico - riguarda la conversione della forza fisica applicata (stimolo meccanico) in una gamma di forze o fenomeni secondari che possono essere rilevati dalle cellule. In secondo luogo, in una fase chiamata meccano-trasduzione, lo stimolo primario o secondario viene convertito in risposta chimica, elettrica o biochimica. La ragione e la spiegazione di questo processo non è ancora certa, ma è indirizzata al ruolo di alcune molecole meccano-trasduttrici quali recettori, canali ionici attivati, proteine G (famiglia di proteine trasduttori) e citoscheletro. La terza fase, la trasduzione del segnale, consente la conversione di un segnale chimico o biochimico in un altro, innescando una cascata di eventi. Infine, si ottiene la conversione completa dello stimolo meccanico in risposta al livello di profondità del tessuto. Modificando l'ambiente meccanico circostante con metodi diversi, è possibile quindi ottenere il controllo dello sviluppo di tessuti e organi ingegnerizzati. [35]

A causa delle suddette forze contrattili esercitate dalle cellule in grado di attaccarsi alla superficie del substrato, diversi studi hanno sviluppato l'idea che la relazione tra queste forze e la rigidità del substrato possano influenzare il comportamento cellulare, come migrazione, proliferazione e apoptosi (morte cellulare programmata e controllata). [34]

Diversi studi hanno infatti dimostrato che le proprietà meccaniche dell'ambiente sono in grado non solo di influenzare il differenziamento delle cellule staminali, ma anche di indirizzare la loro migrazione verso specifici substrati. La migrazione cellulare risulta essere fondamentale in diversi processi fisiologici, come la guarigione delle ferite, la morfogenesi e le metastasi tumorali. Questo processo richiede diversi passaggi coordinati e quasi simultanei, che possono includere la formazione di nuove aderenze, il rilascio di quelle precedenti, lo sviluppo di forze di trazione e molti altri. Durante la migrazione, le cellule devono mantenere una certa velocità e direzione attraverso la superficie su cui si muovono, sulla quale fanno uso di sensazioni tattili, relazionandosi con l'ambiente. È stato dimostrato che i movimenti delle cellule possono essere influenzati e guidati da diversi gradienti, come gradienti di intensità luminosa, potenziale elettrostatico e potenziale gravitazionale. Tuttavia, il processo attraverso il quale il movimento e la migrazione delle cellule sono guidati a causa della presenza di rigidità e gradienti di rigidità nell'ambiente circostante è noto come "durotaxis".

La rigidità dell'impalcatura risulta come una fonte esterna di comunicazione e segnalazione per le cellule coltivate in quello specifico ambiente. Si supponeva che l'influenza delle proprietà meccaniche sul comportamento cellulare potesse essere indirizzata all'azione vincolante passiva esercitata sul tessuto e sui movimenti cellulari dal substrato. Su materiali più rigidi le cellule tendono a muoversi

lentamente ed esercitano forze diverse, e possono anche essere soggette a cambiamenti di forma, che potrebbero influenzare le interazioni cellula-cellula e le funzioni dei recettori. [36]

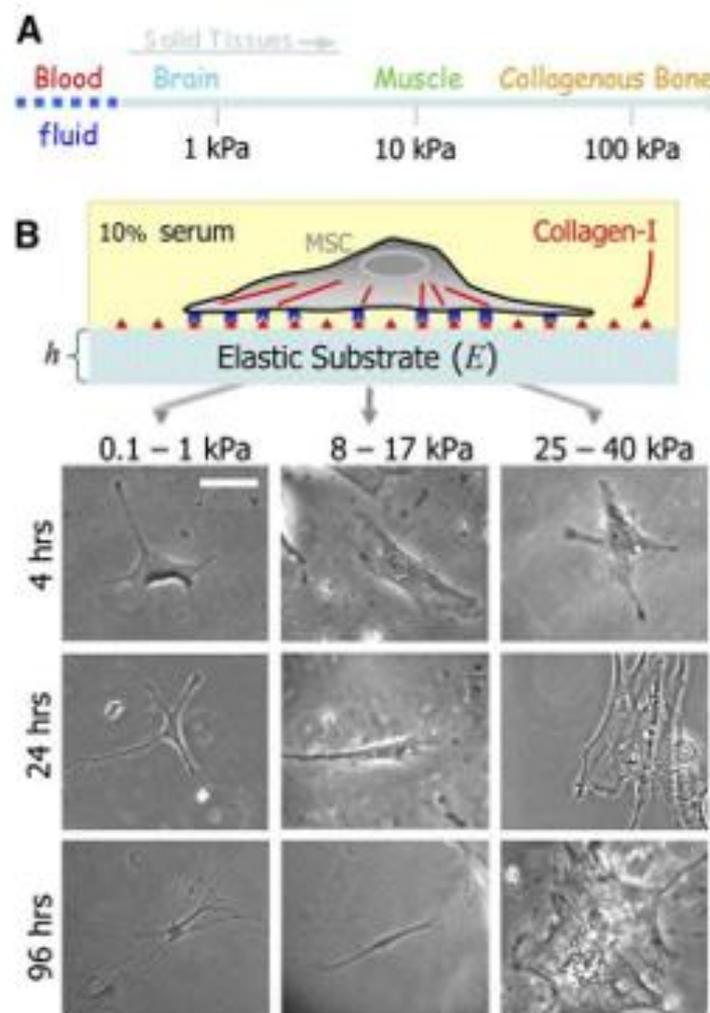


Figura 18: A) I tessuti solidi mostrano una gamma di rigidità, misurata dal modulo elastico E ; B) Il sistema gel in vitro consente il controllo del modulo elastico attraverso la reticolazione e il controllo dell'adesione cellulare mediante innesto covalente di collagene di tipo I.

Altri studi hanno dimostrato che le cellule rispondono molto allo stato fisico della matrice e che l'elasticità esercita effetti molto forti sulla specificazione del lignaggio delle cellule staminali mesenchimali ingenuie, specialmente se assomiglia all'ambiente naturale della cellula specifica. Se le cellule hanno la capacità di tirare contro la matrice, possono percepire la rigidità della matrice e, attraverso meccanismi mecano-trasduttori, generare segnali in base alla forza che devono esercitare per deformare la matrice. [37]

Le cellule staminali mesenchimali sono inizialmente piccole e rotonde, ma crescendo su matrici con moduli elastici nell'intervallo del cervello (0,1-1 kPa) e dei muscoli (8-17 kPa) sviluppano forme ramificate e poligonali

2.2 TIPOLOGIE DI TUMORI E CARATTERISTICHE ASSOCIATE

I tumori possono essere classificati secondo la loro origine in 4 macro-famiglie:

1. I tumori epiteliali (carcinomi) sono le forme più comuni di cancro umano che hanno origine nel strato di cellule (l'epitelio) che rivestono una cavità o un condotto. Tumori che si verificano negli epitelii di quella forma strati cellulari protettivi sono carcinomi a cellule squamose (che si verificano in diversi tipi di organi, compresi la pelle, l'esofago, la prostata, i polmoni e la cervice) e quelli originati dagli epitelii secretori (ad esempio nelle ghiandole) sono gli adenocarcinomi;
2. I tumori mesenchimali (sarcomi) hanno origine nelle cellule mesenchimali. I sarcomi si verificano nel connettivo o tessuto di supporto (ossa, cartilagine, muscoli e grasso) e tessuto molle;
3. I tumori ematopoietici hanno origine nel sistema immunitario e circolatorio. Coinvolgono midollo e tessuti linfatici che comprendono cellule emopoietiche;
4. I tumori neuroectodermici si trovano in componenti del sistema nervoso.

Poiché tutti i tumori derivano da un'alterazione genetica, la natura precisa di queste mutazioni e della cellula deriva dai genotipi in cui si verificano le mutazioni e rappresentano i determinanti di ogni singolo tipo di cancro.

Esistono 3 diversi aspetti da tenere in considerazione:

- il numero di mutazioni richieste per convertire una cellula normale in una cellula cancerosa, infatti ci sono cellule appartenenti a lesioni che hanno subito una o più mutazioni somatiche, ma a meno di numero totale richiesto per dare il cancro. In generale il numero di mutazioni (n) potrebbe essere lo stesso per tutti i tumori e può variare da 2 a 5.
- i geni specifici in cui si verificano le mutazioni e se tentiamo di classificare i tipi di geni che, quando mutati, contribuiscono a provocare il cancro, troviamo il seguente elenco:

1. geni in grado di codificare i fattori di crescita e recettori dei fattori di crescita;
 2. geni che partecipano al segnale di trasduzione nel ciclo cellulare;
 3. geni che controllano la trascrizione e geni che codificano le proteine nucleari;
 4. geni coinvolti nella riparazione del DNA e nei cromosomi di replicazione;
 5. geni responsabili di innescare l'apoptosi delle cellule anormali;
 6. geni coinvolti nelle interazioni delle cellule con la matrice extracellulare ed i vasi sanguigni
- la natura delle mutazioni stesse ed in particolare la mutazione potrebbe essere associata a un fallimento di differenziazione, che può essere considerata come una perdita di funzione, un fallimento dei controlli proliferazione e una perdita di funzione di un gene oncosoppressore. Un argomento importante da considerare è che la trasformazione maligna nelle cellule cambia le loro proprietà meccaniche. Le proprietà meccaniche delle cellule, come la rigidità, la non linearità, l'anisotropia, i cambiamenti nella morfologia cellulare, l'adesione e la sua invasività sono stati ampiamente studiati negli ultimi decenni.

In particolare, la rigidità cellulare può essere determinata mediante aspirazione con micropipette, pinzette ottiche, tracciamento di particelle micro reologia e microscopia a forza atomica (AFM).

Xu et al. [22] hanno studiato le proprietà meccaniche delle cellule di diverse linee cellulari di cancro ovarico e cellule epiteliali della superficie ovarica immortalate non maligne (IOSE). Hanno dimostrato che la rigidità permette di distinguere le cellule di cancro ovarico dalle cellule non maligne, ma anche di distinguere cellule cancerose più tumorigeniche da tipi meno tumorigenici cioè di caratterizzarne l'invasività. È importante notare che il modulo di Young determinato da tecniche di microindentazione con AFM, che saranno dettagliate nei prossimi paragrafi, è fortemente influenzato dalle caratteristiche del citoscheletro, e dal tipo di protocollo utilizzato nel processo.

2.3 IL PANCREAS E LE SUE PROPRIETÀ MECCANICHE

Il pancreas è un organo situato nell'addome in alto a sinistra, dietro lo stomaco ed è circondato da diversi organi, come l'intestino tenue, la milza e il fegato. È una ghiandola lunga e appiattita che pesa 70-80 grammi ed è lunga 15 centimetri. [38] [39]

È diviso in quattro parti:

- La testa è la parte più ampia dell'organo ed è incastonata nella curva del duodeno.
- Il collo è una parte sottile posta tra la testa e il corpo.
- Il corpo è la parte centrale e più grande della ghiandola; è posto davanti all'arteria mesenterica superiore e alla vena.
- La coda è la parte terminale sottile dell'organo e si estende sul lato sinistro, vicino alla milza.

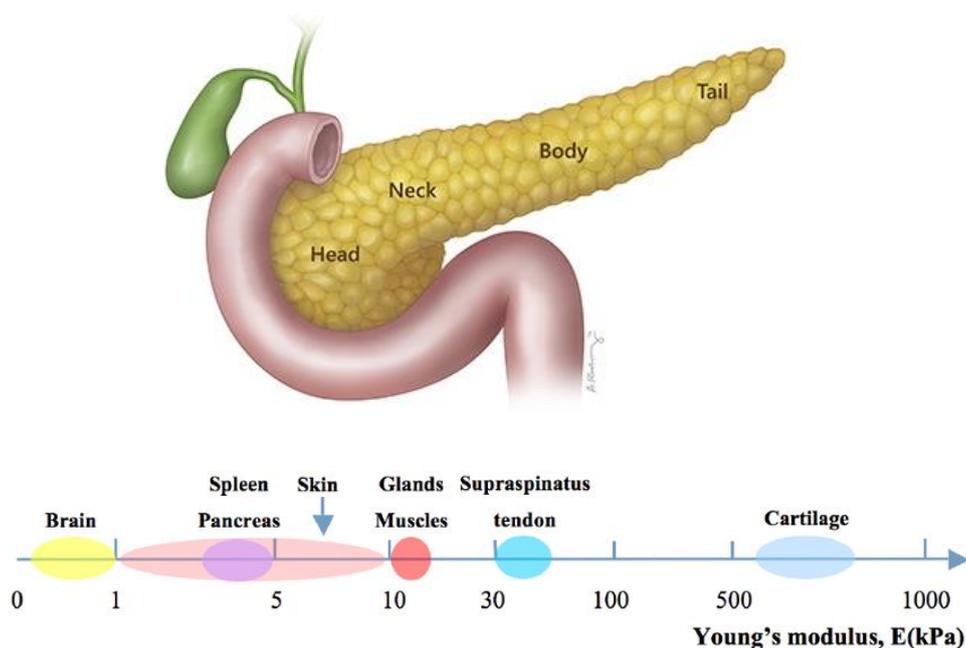


Figura 19: Rappresentazione del Pancreas e la sua collocazione in base al modulo elastico rispetto ad altri tessuti biologici

Il pancreas ha due funzioni principali, una esocrina e una endocrina. Il 95% del pancreas è composto da tessuto esocrino. Questo regola la digestione, poiché contiene cellule che producono gli enzimi giusti (come tripsina, chimotripsina e lipasi) per aiutare la digestione del cibo. Le cellule responsabili della secrezione degli enzimi pancreatici nei dotti pancreatici sono le cellule acinose. I succhi

pancreatici vengono rilasciati in questi dotti che portano al dotto pancreatico principale. Questo drena i fluidi prodotti dalle cellule esocrine nel duodeno. [38] [39]

Il pancreas endocrino, invece, è composto da piccoli gruppi di cellule, chiamate isole di Langerhans, responsabili della regolazione del livello di glucosio. Queste isole secernono ormoni direttamente nel flusso sanguigno. Il glucagone e l'insulina sono i principali ormoni pancreatici: il primo aumenta il livello di glucosio, il secondo invece lo abbassa. La regolazione del livello di zucchero nel sangue è fondamentale per il corretto funzionamento di organi importanti, come cervello e fegato. [38] [39].

I tessuti molli presentano differenti proprietà elastiche, dovute a differenti funzioni e caratteristiche richieste. Per i tessuti molli nativi, il modulo di Young varia da 0,1 KPa a 1 MPa, a seconda delle funzioni e della posizione del tessuto nel corpo. [40]

Non è facile trovare in letteratura valori precisi o standard delle proprietà meccaniche del tessuto pancreatico, in quanto variano da persona a persona, a seconda dell'età, del sesso e di molti altri fattori. Anche per il tessuto pancreatico vi è una sostanziale differenza di caratteristiche meccaniche tra cellule normali e cellule tumorali: questi ultimi sono spesso più rigidi dei tessuti normali, principalmente a causa della desmoplasia. La reazione desmoplastica provoca l'accumulo di componenti dell'ECM, come il collagene di tipo I e V, la fibronectina, secreta dai fibroblasti tumorali e dalle cellule stellate pancreatiche. Il tessuto fibrotico prodotto dalla reazione desmoplastica gioca un ruolo importante nello sviluppo delle cellule tumorali, poiché altera le interazioni tra le cellule tumorali e lo stroma, favorendo la progressione del tumore. Gli studi trovati in letteratura volti a caratterizzare i tessuti pancreatici normali e tumorali riportano valori dei moduli di Young mostrati nella figura 20.

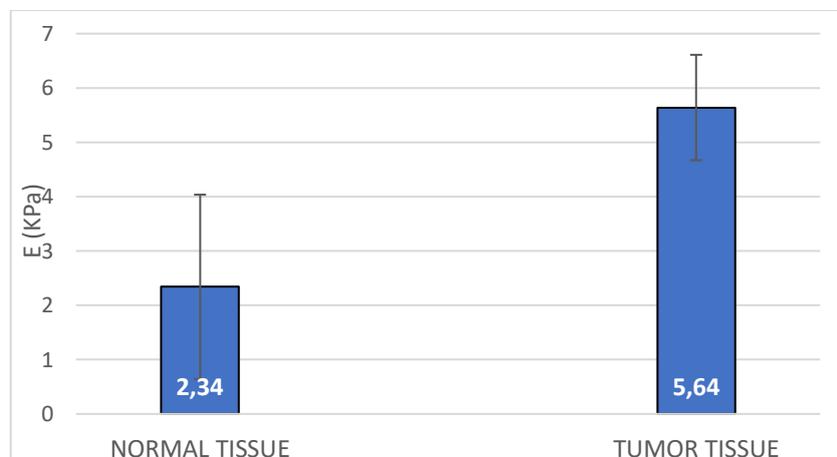


Figura 20: Grafico che riassume con deviazione standard i valori di modulo elastico individuati in letteratura per il tessuto pancreatico sano e tumorale.

I valori di modulo elastico sono compresi tra 1KPa e 7 KPa, con un valore medio di 2,34 KPa per il tessuto pancreatico sano e di 5,64 KPa per i tessuti tumorali. [41] [42]

2.4 SFEROIDI: CULTURE CELLULARI 3D IDEALI

Come già dettagliato nel primo capitolo, in letteratura, si trovano molti studi su culture di cellule in sospensione o in forma aggregata, ma solo negli ultimi anni l'attenzione si è spostata molto sulle culture 3D in quanto più congruenti con le reali condizioni di vascolarizzazione e compattezza dei tumori in vivo.

Questi sferoidi tumorali (Figura 21) sono composti da agglomerati di cellule tumorali in grado di riprodurre sia le interazioni cellula-cellula che le interazioni cellule-matrice, essenziale per raggiungere delle proprietà meccaniche globali di rilievo. Negli sferoidi le cellule sono organizzate in strutture 3D, che mimano più fedelmente le condizioni reali rispetto ai modelli bidimensionali basati su singoli strati di cellule. Inoltre, gli sferoidi possono crescere fino a diverse centinaia di micrometri di diametro e mostrare un gradiente di proliferazione cellulare prossimo a quello reale.

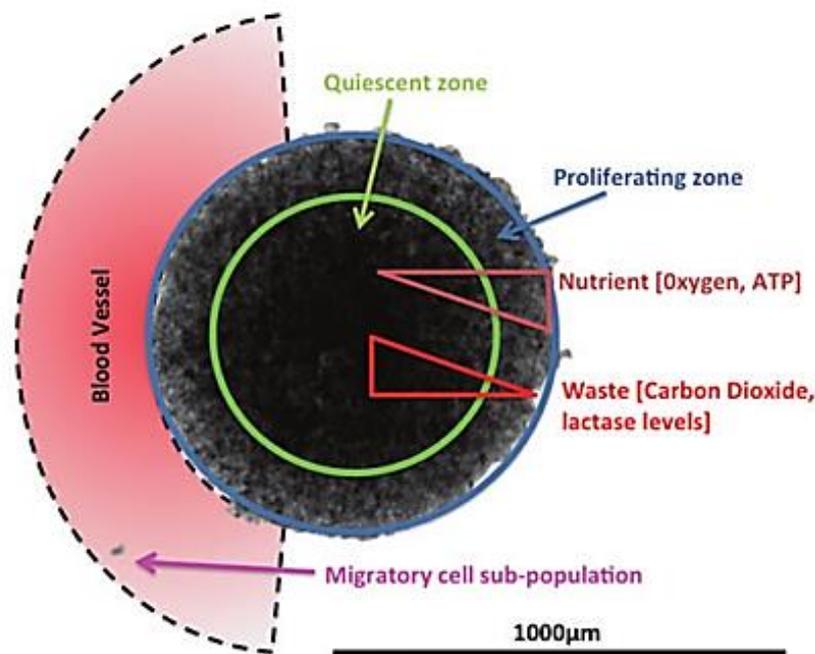


Figura 21: Rappresentazione schematica di microsferi sferoidali 3D con gradienti di nutrienti e rifiuti [24].

Il grado di rappresentazione delle caratteristiche del tumore in vivo deve essere mostrato per ogni singolo sferoide e questo aspetto sottolinea la complessità di tali sistemi, la cui proprietà dipendono da:

- Origine delle cellule tumorali;
- Stato di trasformazione;
- Condizioni di produzione;
- Condizioni di crescita.

Gli sferoidi presentano due caratteristiche chiave che emulano il comportamento dei tumori in vivo:

1. Disomogeneità tra centro e periferia dello sferoide, sia in termini di carico (maggiore in modulo elastico all'interno del volume rispetto alla periferia) che in termini di comportamento cellulare (le cellule al centro sono quiescenti, le cellule in periferia hanno tassi di mitosi più elevati) [42].
2. Crescita influenzata dall'entità del carico esterno (in letteratura è riportato che la velocità massima di crescita si ha quando lo sferoide è scarico).

Rimane quindi evidente come uno sferoide tumorale possa rappresentare la miglior scelta per testare l'efficacia antitumorale di un trattamento ad US a bassa intensità, prima di passare alla sperimentazione su cavie con masse tumorali innestate nel sottocute.

2.5 INDAGINI MICROSCOPICHE

Le moderne tecniche di imaging molecolare hanno notevolmente migliorato la rilevazione del tumore e il follow-up post-trattamento dei pazienti con cancro [43]. In questo contesto, lo sviluppo di culture cellulari 3D *in vitro* per lo studio di farmaci antitumorali ha avuto un consistente impatto nell'ambito della ricerca scientifica. Lo scopo delle indagini descritte in questo capitolo è quello di individuare la struttura di agglomerati cellulari di tumori pancreatici PANC-1 e le proprietà ad essi associate.

La prima metodologia di indagine per la caratterizzazione morfologica e di distribuzione di densità dello sferoide composto da cellule tumorali Panc-1 è stata la Microscopia a Raggi X. La sperimentazione è stata resa possibile grazie al laboratorio CRIST, alla Prof. Paola Paoli ed al suo team di ricerca, i quali hanno messo a disposizione le loro attrezzature e la loro esperienza.

La seconda tecnica di Imaging adottata è stata l'indagine con Microscopio Light sheet e Microscopio confocale con contrasti a fluorescenza, grazie al supporto dei laboratori del European Laboratory for Non-Linear Spectroscopy (LENS) ed al team del Prof. Sacconi.

Il post processing dei dati è stata effettuata mediante l'implementazione di uno script MatLab, il quale ha permesso di individuare le proprietà di interesse: distribuzione di densità e dimensione cellulare media.

Infine come ultimo metodo di indagine, per individuare le proprietà meccaniche degli sferoidi è stata adottata la microscopia a forza atomica (AFM), grazie al supporto della spin off dell'università degli studi di Bologna, SCRIBAnanotecnologie srl.

I dati così ottenuti sono stati integrati con la piattaforma della 3D Experience per realizzare un modello agli elementi finiti capace di simulare gli effetti prodotti di un fascio ad ultrasuoni su uno sferoide tumorale.

2.5.1 MICROTOMOGRAFIA A RAGGI X

L'indagine microtomografica funziona esattamente come la comune Tomografia assiale computerizzata a raggi X ma con la particolarità di poter concentrare la sorgente in fasci estremamente ridotti con un controllo accurato dell'intensità di raggi emessi ed avere un superficie ricevente, normalmente una telecamera di acquisizione con alta risoluzione spaziale, tale da permettere di acquisire le immagini tridimensionali di oggetti anche molto piccoli. Particolare attenzione viene richiesta nel posizionamento del campione da scansionare, infatti se l'asse di rotazione, mostrato nella figura 22, non risulta adeguatamente allineato con l'asse principale il processo di ricostruzione 3D, svolto dal software della macchina non restituisce immagini nitide.

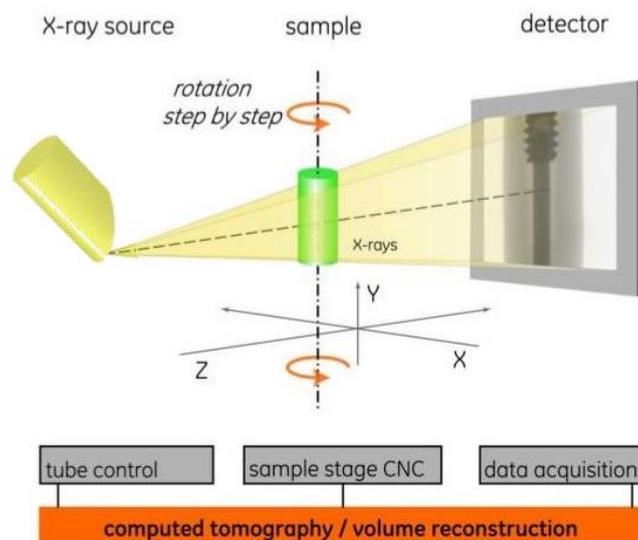


Figura 22: Schema Microtomografia a raggi X

La preparazione degli sferoidi di Panc-1 è stata effettuata dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Annarosa Arcangeli, in particolare, dalla Dott.ssa Claudia Duranti, presso il Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche secondo un protocollo da loro perfezionato [44]. È stato

predisposto un baselayer in un MultiWells da 96 pozzetti, aggiungendo 50 μ l di agar al 1,5%. La separazione della cellula avviene mediante l'enzima Tripsina, mentre il conteggio è svolto nella camera di Burker. In seguito, sono seminate con una concentrazione di 10³ cellule per ogni pozzetto, all'interno del quale crescono per 96h . Dopo 96 ore, gli sferoidi sono completamente formati ed assumono la caratteristica forma da cui prendono il nome: la figura 23 mostra un'immagine acquisita al microscopio ottico per verificare la qualità dei campioni seminati.

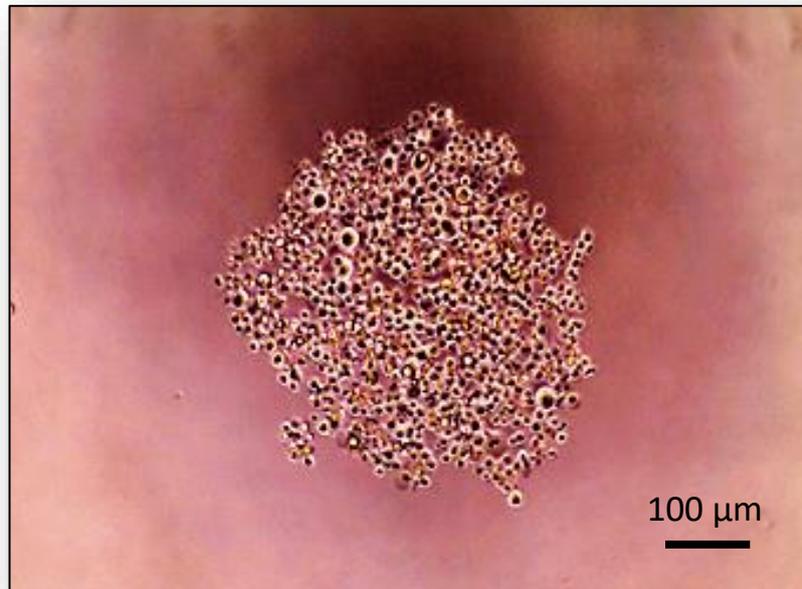


Figura 23: Sferoide Panc-1 dopo 96 ore di Cultura cellulare acquisito con microscopio ottico

Una prima criticità riscontrata durante la procedura di preparazione del campione per l'analisi ha riguardato il posizionamento efficace del singolo sferoide in cultura all'interno del Microtomografo. La configurazione ideale sarebbe consistita nel collocare il 96 MultiWells senza dover spostare il singolo sferoide; purtroppo il materiale del MultiWells (PMMA) non risulta essere perfettamente trasparente ai raggi X, il che comporterebbe necessariamente un'immagine con perdita di contrasto. Questa condizione ha costretto il prelievo del singolo sferoide con una pipetta (P1000) per essere collocato in due configurazioni: su un vetrino coprioggetti e all'interno di un capillare in vetro borosilicato.

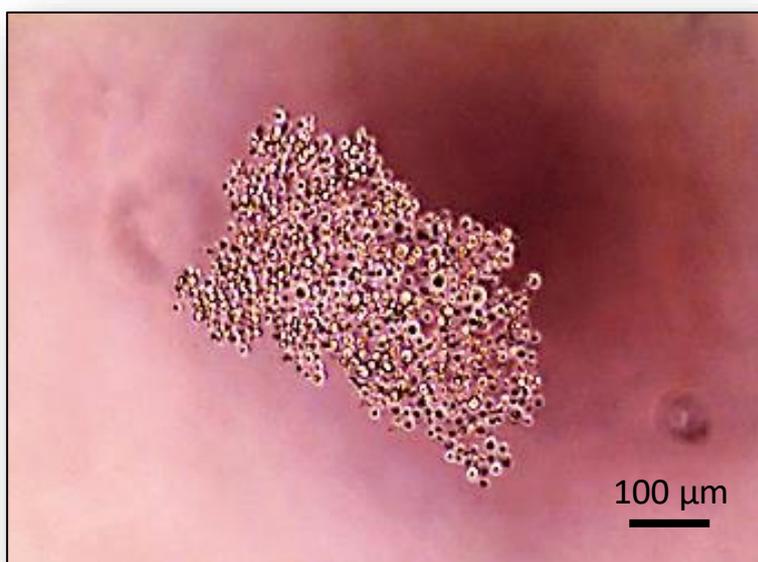
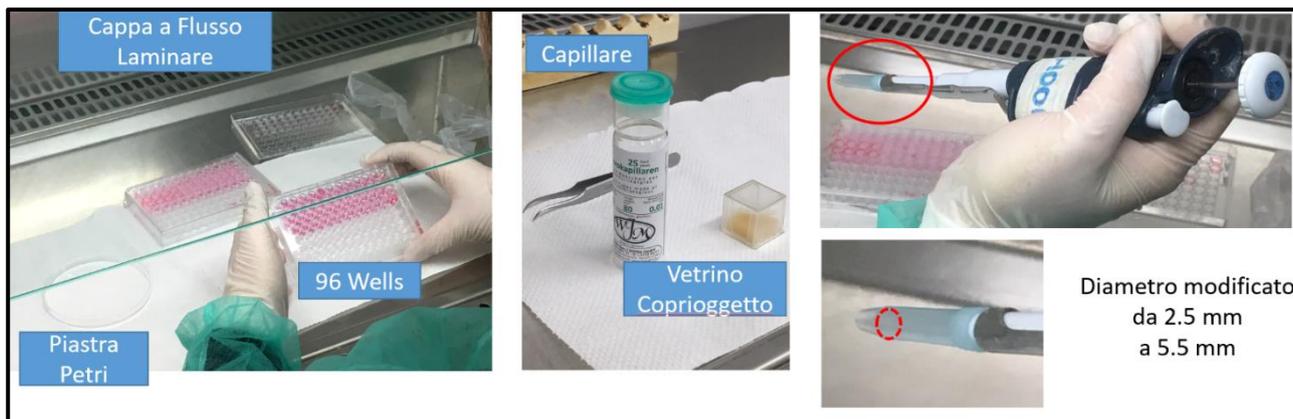


Figura 24: a) Processo di prelievo dal multiwell da 96 sotto cappa laminare e deposito sui due supporti scelti per mezzo di una punta di prelievo modificata per la dimensione dei pozzetti di cultura; b) Sferoide Panc-1 con deformazioni morfologiche dopo il processo di prelievo e collocamento sul vetrino acquisto con microscopio ottico.

Il processo mostrato in figura 24 (a) di prelievo e deposito è risultato non idoneo a preservare le caratteristiche meccaniche e morfologiche degli sferoidi infatti solo dopo numerosi tentativi, in cui gli sferoidi prelevati si erano disgregati completamente, siamo riusciti ad ottenere dei campioni ancora in condizioni accettabili figura 24 (b) per poter procedere all'analisi microtomografica: il livello di successo di questa procedura è di 1 ogni 10 sferoidi prelevati.

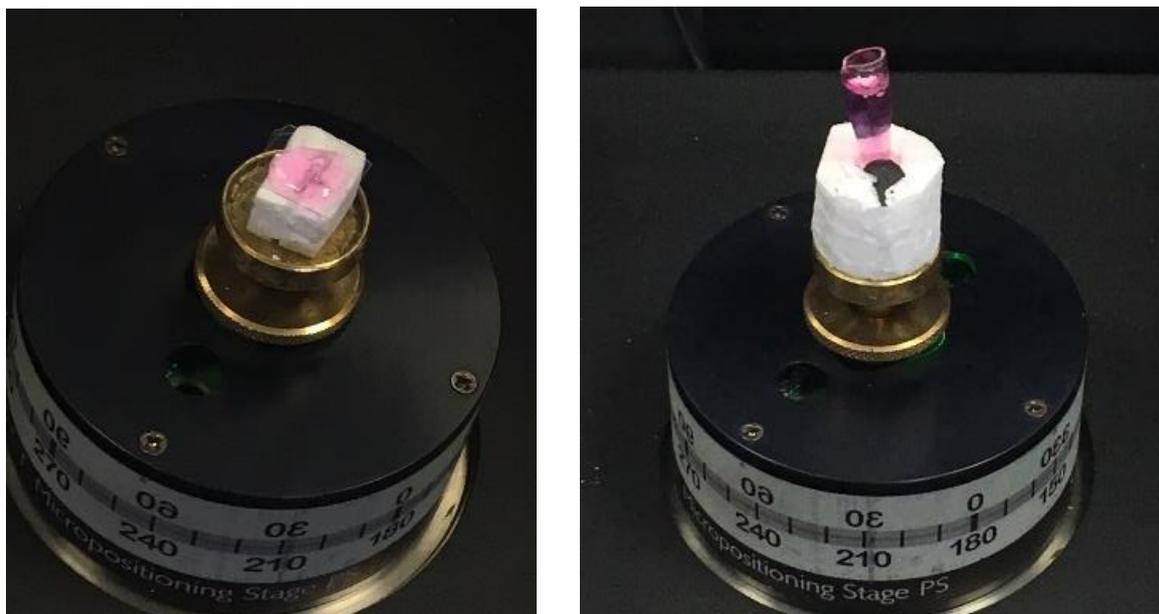


Figura 25: Sferoidi Panc-1 collocati all'interno del microtomografo sui due supporti: Vetrino (a), Capillare (b)

Dopo aver collocato i due supporti scelti per l'analisi sul supporto all'interno del microtomografo si è quindi proceduto con il processo di scansione a raggi X.

I risultati della scansione purtroppo non hanno permesso di acquisire alcuna informazione sul campione analizzato: per effetto della somministrazione dei raggi x, la fase acquosa del terreno di cultura è completamente evaporata, come mostrato nella figura 26 (b) portando inevitabilmente alterazioni morfologiche e di distribuzione di densità tali da compromettere il campione ed i risultati connessi all'analisi.

La seconda soluzione adottata con il campione posizionato all'interno del capillare in borosilicato ha permesso di contenere l'evaporazione della fase acquosa al 25% ma nonostante questo buon risultato, ottenuto anche riducendo la dose di raggi x a cui veniva esposto il campione, si è presentato un fenomeno di shifting dello sferoide nel terreno di cultura che non ha permesso di ricostruire in fase di post-processo la reale immagine dello sferoide ma solo un'ombra allungata nella zona centrale della scansione come identificato nella figura 26 (c)

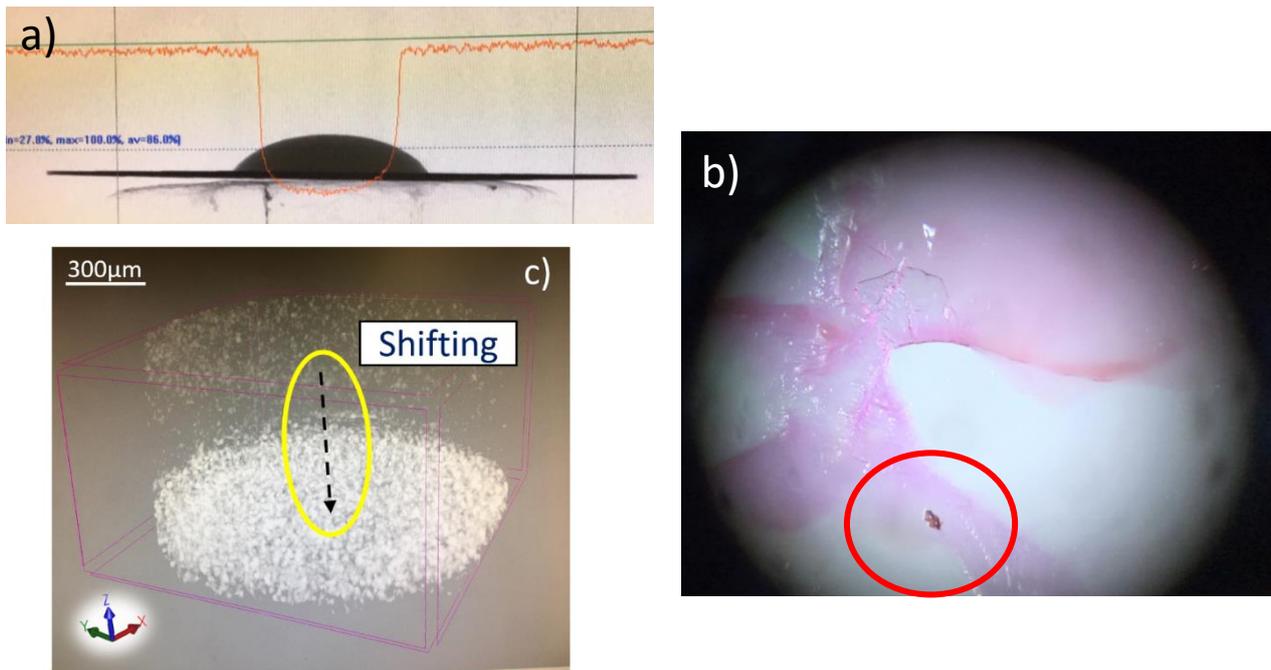


Figura 26: Analisi dello spettro di risposta della goccia di terreno di cultura depositata sul vetrino portaoggetto (a); immagine dello sferoide post Microtomografia a raggi x con terreno di cultura essiccato (b); direzione di shifting dello sferoide durante la scansione e l'evaporazione della fase acquosa del terreno di cultura (c).

Nonostante gli sforzi ed i numerosi tentativi che hanno portato all'esaurimento di tutti i 180 sferoidi preparati per la sperimentazione, non è stato possibile individuare un protocollo robusto che portasse a risultati affidabili. Si è quindi concluso che la metodologia appena illustrata non rappresenta una scelta idonea per la caratterizzazione morfologica 3D dello sferoide in una soluzione di cultura cellulare.

2.5.2 MICROSCOPIA A FLUORESCENZA: CONFOCALE E LIGHTSHEET

La seconda metodologia di indagine adottata è stata la microscopia confocale che è una tecnica ottica principalmente utilizzata per lo studio tridimensionale di strutture biologiche isolate o in situ. In questa tecnica un raggio laser focalizzato colpisce un punto del campione, solitamente trattato con sostanze fluorescenti. La luce emessa dai fluorocromi eccitati dal laser viene catturata dalle lenti dell'obiettivo, attraversa lo specchio dicroico e raggiunge il fotomoltiplicatore, che trasforma l'intensità luminosa in un segnale elettrico di intensità proporzionale (Figura 27). Tra lo specchio dicroico ed il fotomoltiplicatore, il fascio luminoso attraversa un diaframma, o pinhole, che impedisce alla luce proveniente dalle zone fuori fuoco di raggiungere il fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano di fuoco viene registrato e utilizzato nella formazione dell'immagine finale [45].

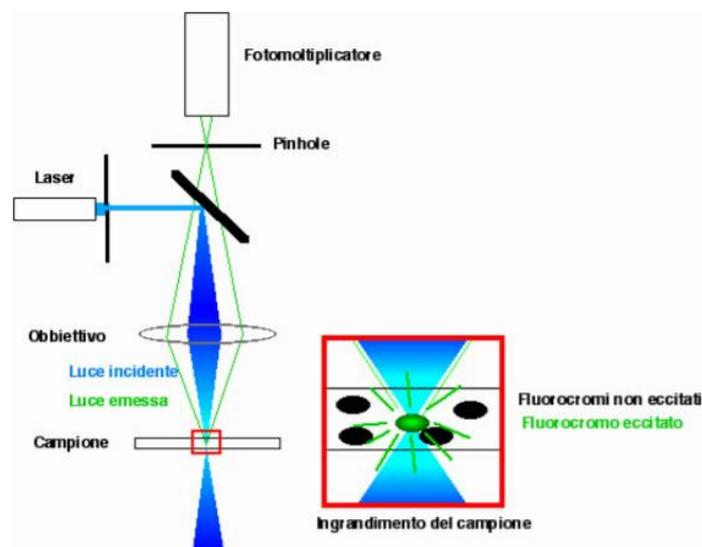


Figura 27: Schema funzionamento microscopio confocale

Il risultato è un'immagine poco disturbata dalla diffusione della luce delle zone non a fuoco. Per ottenere la rappresentazione di un intero piano, si muove il fascio di luce lungo il campione di punto in punto, in modo che tutto il piano situato alla profondità voluta venga illuminata dal fascio di luce secondo una precisa sequenza. Questo processo viene detto scansione. Il segnale elettrico in uscita dal fotomoltiplicatore viene quindi digitalizzato ed inviato ad un computer che registra i valori di intensità misurati per ogni punto; successivamente, tali valori sono utilizzati per ricostruire l'immagine. Spostando lungo l'asse verticale il campione dopo ogni scansione, è possibile eseguire una serie di scansioni successive corrispondenti ai piani focali via via più profondi all'interno del campione. Queste scansioni prendono il nome di sezioni ottiche e la loro sovrapposizione ordinata, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scandito, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco.

Per l'elaborazione delle immagini sono utilizzati dei programmi (ImageJ, Matlab) in grado di fornire la luminosità di ciascun punto, la localizzazione nel campione, la posizione in un piano e la sua profondità.

Il microscopio utilizzato è stato impostato per effettuare acquisizioni mediante obiettivo 10X con uno z-step di $25 \mu m$ e pixel size di $1,265 \mu m$ (x, y) ed è mostrato nella figura 28. Sono state eseguite 3 scansioni di 10 slices ciascuna, ottenendo circa il 57% dello sferoide.

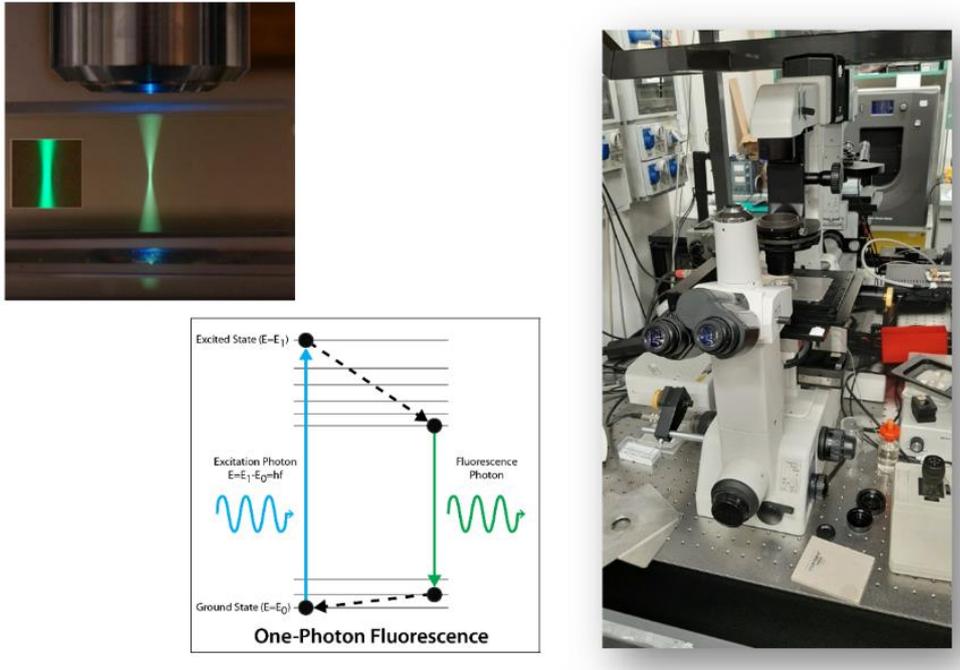


Figura 28: Microscopio confocale e relativo schema energetico

La tecnica di microscopia detta a 2 fotoni si basa sul principio che prevede la possibilità, l'evento quantistico, in cui due fotoni giungono simultaneamente sulla molecola di fluoroforo. Se questo evento si verifica e i due fotoni hanno in totale energia sufficiente a portare la molecola allo stato eccitato, si può avere lo stesso effetto dell'eccitazione che si otterrebbe con un singolo fotone con la stessa energia [45].

La strumentazione del microscopio presenta i seguenti componenti: un laser Titanio Zaffiro al femtosecondo (vicino all'infrarosso) in grado di fornire degli impulsi rapidi ad alta potenza, andare in profondità, raggiungere il punto focale ed eccitare il fluoroforo (Figura 29). L'utilizzo di un sistema di lenti permette di collimare il laser, affinché sia polarizzato in una sola direzione; uno specchio dicroico lascia passare lunghezze d'onda sopra ad una di riferimento e ne riflette quelle sotto: nello studio in esame la lunghezza d'onda utilizzata è di circa 800 nm e quindi, di conseguenza, vengono rilevate valori λ superiori a tale lunghezza e scartate quelle sottostanti; due sistemi di filtraggio consentono la selezione del colore desiderato, in questo caso tra 490 nm e 530 nm , lunghezza d'onda del colorante impiegato. Infine, una serie di motorini nanometrici, un sistema piezoelettrico, un pantografo e un obiettivo consentono di spostare e di visualizzare il campione, posto all'interno di una piastrina Petri.

Il microscopio utilizzato è stato impostato per effettuare acquisizioni mediante obiettivo 10X con uno z-step di $5\text{ }\mu\text{m}$ e pixel size di $1,265\text{ }\mu\text{m}$ (x, y). È stata realizzata un'unica scansione di 61 slices, ottenendo circa il 64% dello sferoide.

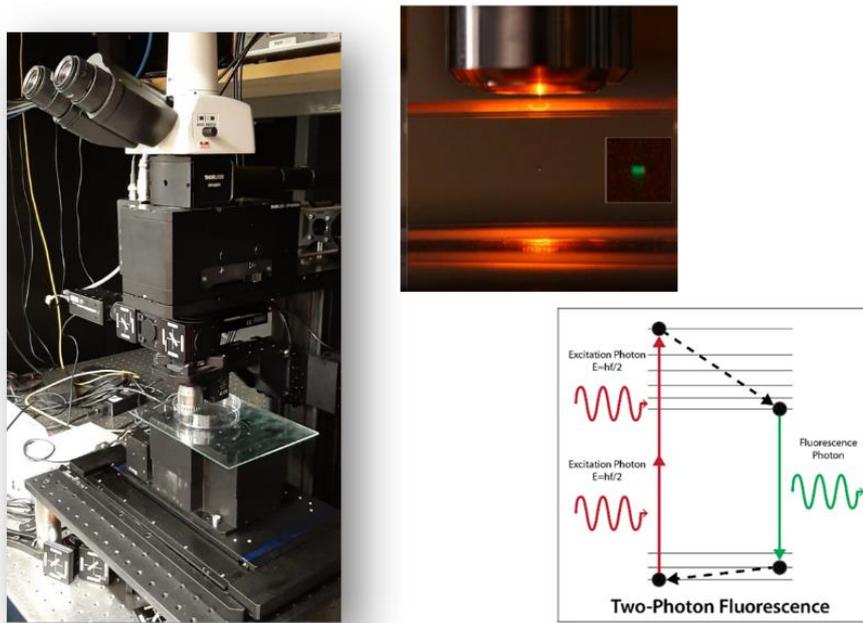


Figura 29: Microscopio a 2 Fotoni e relativo schema energetico

Le immagini sono acquisite per mezzo del programma RS image in formato TIF al tempo t_0 , attraverso l'utilizzo di un microscopio con un ingrandimento 10X. Affinché sia possibile la corretta visualizzazione dello sferoide, si utilizza il marcatore a fluorescenza Calcein AM (ThermoFisher, C1430), che presenta lunghezza d'onda compresa nell'intervallo tra 495 nm e 515 nm, visibile nel verde (Figura 30).

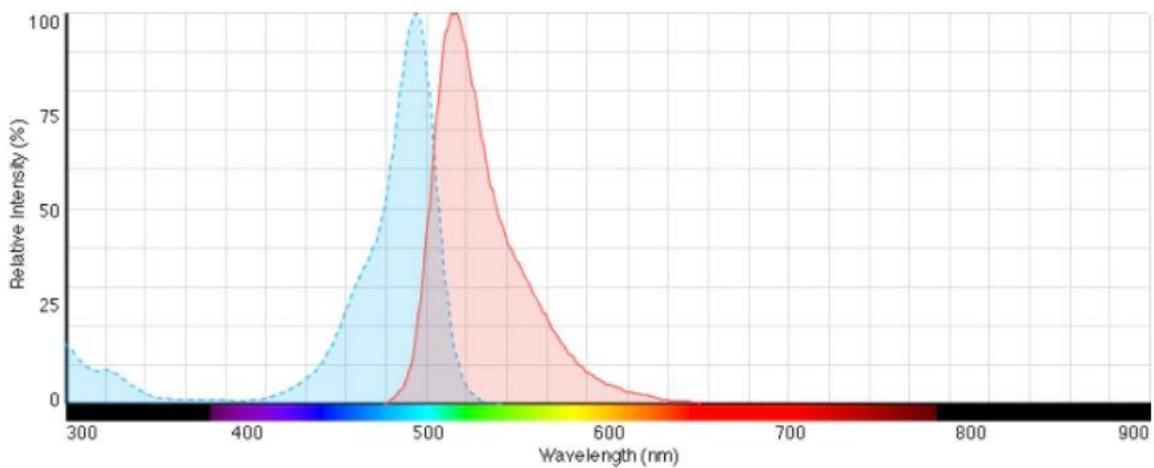


Figura 30: Lunghezza d'onda Calcein AM

2.5.2.1 MATLAB POST-PROCESSING DELLE IMMAGINI MICROSCOPICHE

L'elaborazione delle immagini è stata svolta servendosi di immagini (Stack) ricavate da microscopia confocale, poiché in grado di fornire informazioni e dettagli maggiormente rilevanti per la caratterizzazione delle proprietà dello sferoide cellulare rispetto alla microscopia a due fotoni che utilizza livelli troppo bassi di energia che non sono sufficienti ad illuminare in nucleo dello sferoide. Le immagini utilizzate presentano dimensione pari a 1024x1024 pixels e risoluzione orizzontale e verticale pari a 96 DPI.

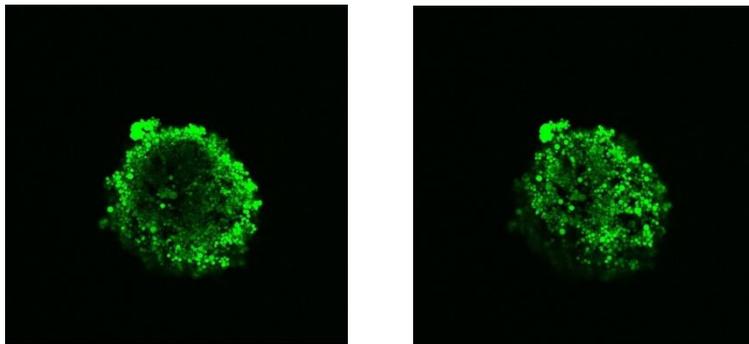


Figura 31: a) Stack0007 ; b) Stack0005

La valutazione della densità dell'anello esterno è stata messa a punto sulle immagini “*Stack0007*” e “*Stack0005*” corrispondenti a sue sezioni trasversali dello sferoide poste a $Z_{007}=230\mu\text{m}$ e $Z_{005}=50\mu\text{m}$ poiché rappresentative nel primo caso del nucleo e dello spessore dell'anello esterno (Figura 31a) e nel secondo caso del solo dell'anello esterno (Figura 31b).

Il primo passaggio fondamentale per l'elaborazione dei dati è stata la trasformazione in scala di grigi, eseguita con un semplice script MatLab (figura 32)

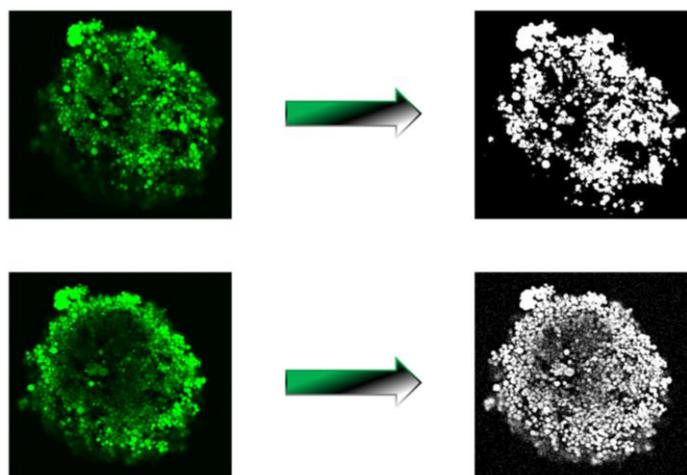


Figura 32: Trasformazione in Grayscale

```

clear all;
close all;
%Regione esterna su immagine Stack0007
%Inserire il percorso del file
rgb_image=imread('C:\Users\Documents\MATLAB\Stack0007.jpg');
%Visualizzazione dell'immagine originale
figure; imshow(rgb_image); title('Stack0007');
%Conversione immagine da rgb a hsv
hsv_image=rgb2hsv(rgb_image);
H=hsv_image(:,:,1);
S=hsv_image(:,:,2);
V=hsv_image(:,:,3);

```

L'immagine "Stack0007" è stata importata e convertita da rgb a hsvt tramite il comando **rgb2hsv**, che fornisce Tinta (H), intensità (S) e Livelli di Grigio (V).

```

%Individuazione della soglia dell'immagine in livelli di grigio
T= graythresh(V);
%Conversione binaria dell'immagine
g = im2bw(V,T);
figure; imshow(g);title('Stack0007');
%Calcolo dell'area cellulare dell'immagine g
area_image=regionprops(g, 'area');
%Conversione dell'area da struct a matrice
area_image_cell=struct2cell(area_image);
area_image_array=cell2mat(area_image_cell);

```

Mediante il comando **graythresh** si calcola una soglia servendosi del metodo di *Otsu*, in grado di scegliere tale soglia al fine di minimizzare la varianza intraclasse dei pixel bianco e nero. In seguito, attraverso il comando **im2bw** è stata convertita l'immagine "V" in scala di grigi in immagine binaria "g", sostituendo tutti i pixel nell'immagine di input con intensità maggiore del livello T con il valore 1 (bianco) e convertendo tutti gli altri pixel con il valore 0 (nero).

Il comando **regionprops** ha permesso di valutare il numero di pixel bianchi dell'immagine, memorizzando il valore in "area_image" in formato *struct* e, successivamente, è stato convertito in formato double "area_image_array", affinché fosse utilizzato per le operazioni seguenti.

```

%Calcolo dimensione matrice area_image_array
[N,M]=size(area_image_array);
area_vector=zeros;
%Seleziona le aree comprese tra [95-130) pixel

```

```

for i=1:M
if (area_image_array(i))>=95 && (area_image_array(i))<130
    area_vector(i)=area_image_array(i);
end
end
%area media cellula esterna
%elimino i valori uguali a zero presenti nel vettore area_vector
area_vector(area_vector==0)=[];
    area_media=round(mean(area_vector));
    tot_area=sum(area_vector);

```

Attraverso il comando **size** si considera la dimensione di “*area_image_array*”, mentre l’applicazione **Image Region Analyzer** ha permesso di selezionare le regioni che presentavano un numero di pixel bianchi compreso tra 95 e 130; queste sono state, poi, salvate in “*area_vector*”. Infine, servendosi del comando **mean** è stata calcolata la media delle aree salvate nel vettore “*area_vector*” e il valore è stato approssimato all’intero più vicino utilizzando il comando **round**.

```

%Individuo posizione ed area da selezionare per ritagliare l'immagine
rect_ext=[690 550 79 79];
%Crop immagine di area e posizione selezionato tramite rect
crop_image_ext=imcrop(g,rect_ext);
%Conversione immagine da logical a double
crop_imaged_ext=im2double(crop_image_ext);
figure;imshow(crop_imaged_ext);title('Crop Stack0007');
%Calcolo dimensione crop_imaged_ext
[u,p]=size(crop_imaged_ext);
%Calcolo delle aree cellulari dell'immagine crop_imaged_ext
area_image_ext=regionprops(crop_image_ext, 'area');
%Conversione da struct a matrice
area_image_cell_ext=struct2cell(area_image_ext);
area_image_array_ext=cell2mat(area_image_cell_ext);

```

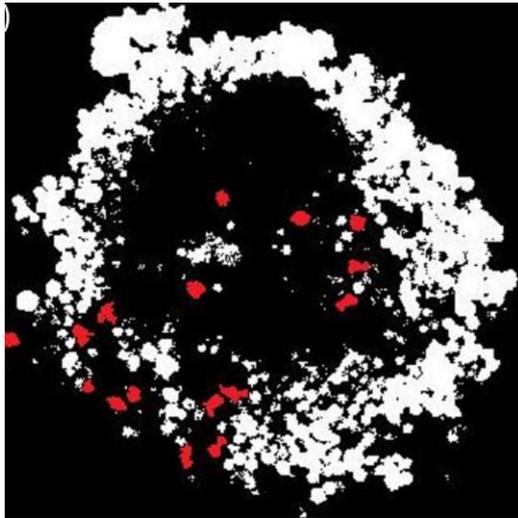


Figura 33: Selezione delle cellule isolate ben individuabili come singole

Il comando **imcrop** permette di ritagliare una regione dell'immagine "g" con le coordinate e le dimensioni del vettore "rect_ext": in ogni crop considerato, sono state scelte le dimensioni 79x79 pixel, poiché corrispondono ad un'area di 10000 μm^2 presa come area campione. Dopo aver convertito l'immagine "ritagliata" da *logical* a *double* e averla visualizzata, ne sono stati determinati il numero di pixel bianchi e trasformato da *struct* a *double*, come in precedenza.

```

cropped_ext=zeros;
%Selezione aree dell'immagine crop_imaged_ext con numero di pixel >1
for z=1:length(area_image_array_ext)
if (area_image_array_ext(z))>1
    cropped_ext(z)=(area_image_array_ext(z));
end
end
cropped_ext(cropped_ext==0)=[]; %elimino gli zeri dal vettore
%Calcola la somma delle aree con un numero di pixel>1
area_cropped_ext=sum(cropped_ext);
%approssimo a numero intero più vicino
cellule_ext=round(area_cropped_ext/area_media);
%Calcolo della densità cellulare sull'area u*p
densita_ext=cellule_ext/(u*p); %cellule su pixel
%Conversione pixel in micrometri
densita_micro_ext=densita_ext/(1.265)^(2);
%L'unità di misura è porzione di cellule su micrometri quadrati

```

Sono state selezionate le aree con numero di pixel maggiore di 1 e salvate all'interno del vettore "cropped_ext". Il numero di cellule all'interno dell'immagine "ritagliata" è stato individuato utilizzando il rapporto tra la somma delle aree selezionate e "area_media" e, in seguito, è stato diviso per l'area dell'immagine "ritagliata" per calcolare la densità di cellule su pixel. Infine, quest'ultima è stata convertita in cellule su μm^2 , considerando dimensioni del pixel di $1,265 \mu\text{m}$.

%Calcolo densità media totale

$\text{densita_totale_esterna}=(\text{densita_micro_ext}+\text{densita_micro_ext1}+\text{densita_micro_ext2}+\text{densita_micro_ext3})/4;$

Come sostegno dei risultati ottenuti è stato effettuato lo stesso procedimento, valutando la densità in un minimo di 4 diverse regioni e calcolandone la media "densita_totale_esterna" (Figura 34).

Per un confronto del valore di densità sull'anello esterno è stata eseguita la medesima procedura sull'immagine "Stack0005"

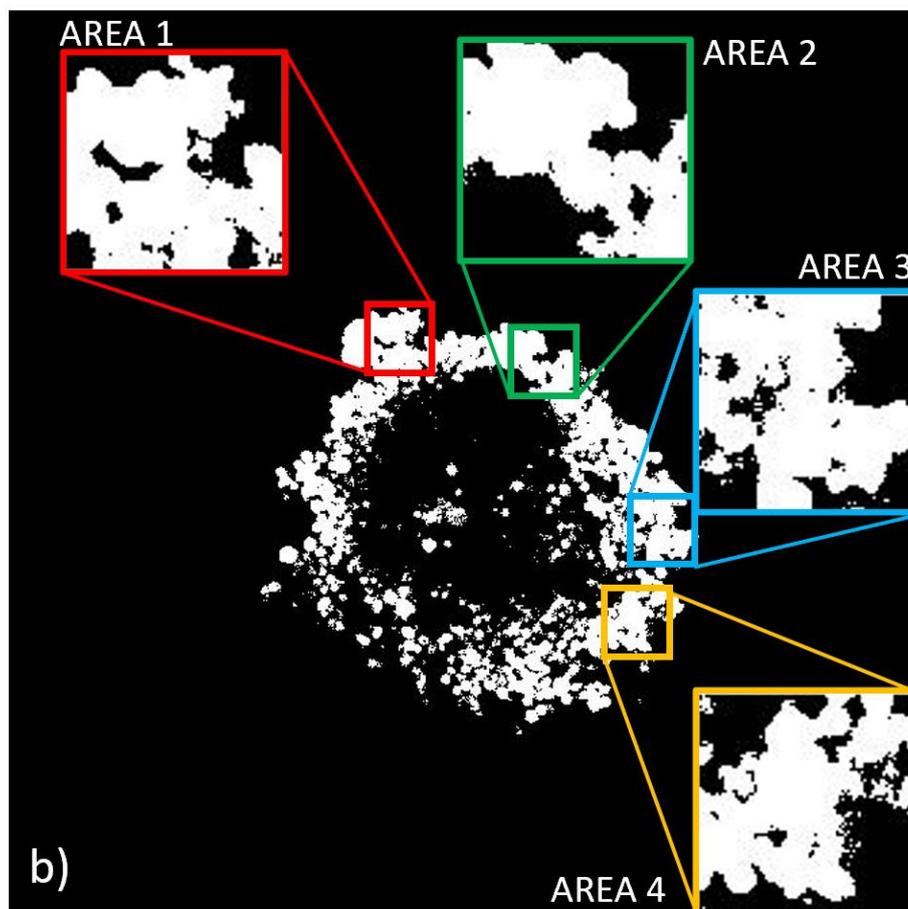


Figura 34: Selezione da un minimo di 4 aree ad un massimo di 10 aree su Stack0007 per il calcolo della densità sull'anello esterno dello sferoide

Per la valutazione della densità del nucleo, a causa della sua estrema compattezza, sono stati applicati ulteriori filtri, ciò ha permesso di analizzarlo con lo stesso metodo utilizzato per l'anello esterno. L'elaborazione dell'immagine è stata effettuata in Photoshop, modificando solo i seguenti parametri:

- Luminosità: +3
- Contrasto: +10
- Mezzitoni: +75
- Intensità: -83
- Tonalità e tinta: -128
- Saturazione: +95

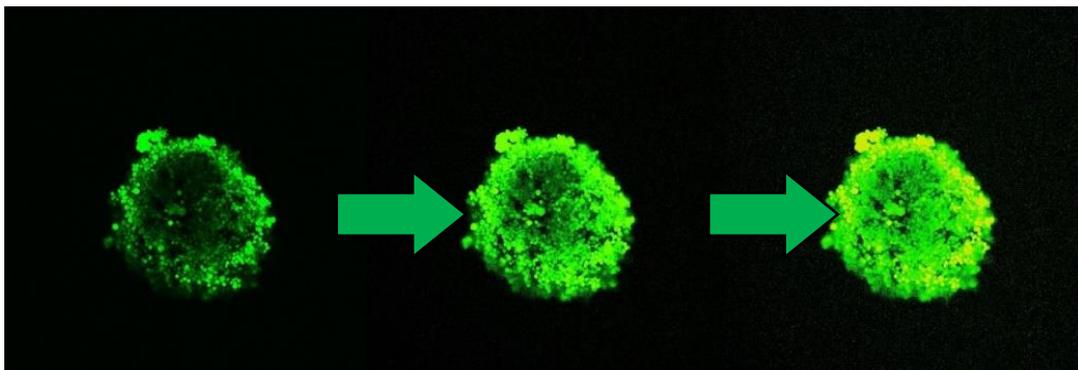


Figura 35: Modifica Stack0007 tramite Photoshop

Dall'elaborazione precedente è risultato che l'area media di una singola cellula corrisponde a $189 \mu m^2$; di conseguenza, in un'area campione di $10000 \mu m^2$, rilevata sull'anello esterno, sono presenti 33 cellule. Per calcolare la densità volumetrica è stato considerato il raggio medio di una cellula pari $7,6 \mu m$. Il valore ottenuto è pari 319 cellule all'interno del volume campione ($1000000 \mu m^3$). Dal momento che la massa della cellula dello sferoide Panc-1 è pari a $3,5 ng$, la densità per l'anello esterno risulta essere $1,117 g/cm^3$.

Per stimare il fattore di impacchettamento che determina la densità volumetrica sono state acquisite una serie di immagini con slice Zstack di $10 \mu m$, da questa analisi è emerso che su 10 sferoidi la disposizione delle cellule nell'anello esterno si avvicina ad una disposizione Cubica a Corpo Centrato, per quanto riguarda il Nucleo invece la disposizione risulta essere più simile alla Cubica a Facce Centrate da cui ne deriva anche una maggiore densità di massa.

Per la misura del raggio dello sferoide è stato utilizzato il software ImageJ, impostando i valori del pixel size pari a $1,265$. È risultato un valore pari a $235 \mu m$.

Dopo la messa a punto dello script in Matlab si è proceduto ad elaborare tutti i 10 sferoidi acquisiti durante il protocollo sperimentale ed i risultati delle elaborazioni sono riassunti nelle tabelle 7 e 8

MEDIA PIXEL PER CELLULA	AREA PIXEL (μm^2)	AREA CELLULA (μm^2)	AREA CAMPIONE (μm^2)	N. CELLULE IN AREA CAMPIONE	FATTORE DI IMPACCHETTAMENTO
118	1,600	189	10000	33	0,62
RAGGIO MEDIO CELLULA (μm)	VOLUME MEDIO CELLULA (μm^3)	STRATI CELLULARI NEL VOLUME DI RIF.	VOLUME CAMPIONE (μm^3)	N. CELLULE IN VOLUME CAMPIONE	
7,6	1952	9,7	1000000	319	
DENSITA (cellule/ $10^6 \mu m^3$)	DENSITA (milioni di cellule/ml)	MASSA CELLULA (ng)	DENSITA (g/cm^3)	RAGGIO SFEROIODE (μm)	ANELLO ESTERNO
0,000319241	319	3,5	1,117	235	

Tabella 7: Parametri corrispondenti all'anello esterno dello sferoide.

Una procedura analoga è stata eseguita per la valutazione del nucleo, ottenendo una densità pari a $1,625 g/cm^3$ e un valore del fattore di impacchettamento pari a 0,91. Il raggio del nucleo dello sferoide è risultato pari a $150 \mu m$.

MEDIA PIXEL PER CELLULA	AREA PIXEL (μm^2)	AREA CELLULA (μm^2)	AREA CAMPIONE (μm^2)	N. CELLULE IN AREA CAMPIONE	
118	1,600	189	10000	48	
RAGGIO MEDIO CELLULA (μm)	VOLUME MEDIO CELLULA (μm^3)	STRATI POSSIBILI DI CELLULE	VOLUME CAMPIONE (μm^3)	N. CELLULE IN VOLUME CAMPIONE	FATTORE DI IMPACCHETTAMENTO
7,6	1952	9,7	1000000	464	0,91
DENSITA (cellule/ $10^6 \mu m^3$)	DENSITA (milioni di cellule/ml)	MASSA CELLULA (ng)	DENSITA (g/cm^3)	RAGGIO NUCLEO (μm)	NUCLEO
0,00046435	464	3,5	1,625	150	

Tabella 8: Parametri corrispondenti al nucleo interno dello sferoide

Per la stima del fattore di proliferazione è stato necessario valutare il numero di cellule dello sferoide al momento dell'acquisizione delle immagini. Tale calcolo si è basato nel determinare il volume del nucleo dello sferoide e dell'anello esterno moltiplicati per le rispettive densità. Conoscendo il numero di cellule iniziali e ipotizzando una proliferazione cellulare lineare nelle 96 ore, è risultato un valore K pari a 268.

VOLUME SFEROIDE (μm^3)	VOLUME NUCLEO (μm^3)	CELLULE NUCLEO
54361596	14137167	6565
VOLUME SFEROIDE (mm^3)	VOLUME ANELLO ESTERNO (μm^3)	CELLULE ANELLO ESTERNO
0,054361596	40224429	12841
CELLULE INIZIALI	CELLULE TOTALI	FATTORE DI PROLIFERAZIONE [K]
103	19406	268

Tabella 9: Parametri necessari per il calcolo del fattore di proliferazione (K).

La procedura sino ad ora illustrata è stata messa a punto su una popolazione di 10 sferoidi provenienti dalla stessa sessione di cultura cellulare allo stadio di accrescimento corrispondente a 96h di incubazione.

L'elaborazione dei dati deriva quindi dalle acquisizioni ottenute tramite microscopia confocale, la quale ha fornito immagini più dettagliate per lo studio in esame rispetto alla microscopia a due fotoni; in particolare, ha reso possibile calcolare parametri rilevanti, come densità del nucleo e dell'anello esterno, necessari per le fasi successive e per la creazione del modello agli elementi finiti.

Dai risultati acquisiti si evince che la densità del nucleo dello sferoide è maggiore rispetto alla densità dell'anello esterno come si riscontra in letteratura per altre tipologie di sferoidi [46]. Inoltre, i valori ottenuti, pari a $1,117 \text{ g/cm}^3$ nell'anello esterno e $1,625 \text{ g/cm}^3$ nel nucleo, sono rispettivamente maggiori della densità media del tessuto pancreatico sano ($1,080 \text{ g/cm}^3$), confermando una densità superiore nello sferoide tumorale [46],[47].

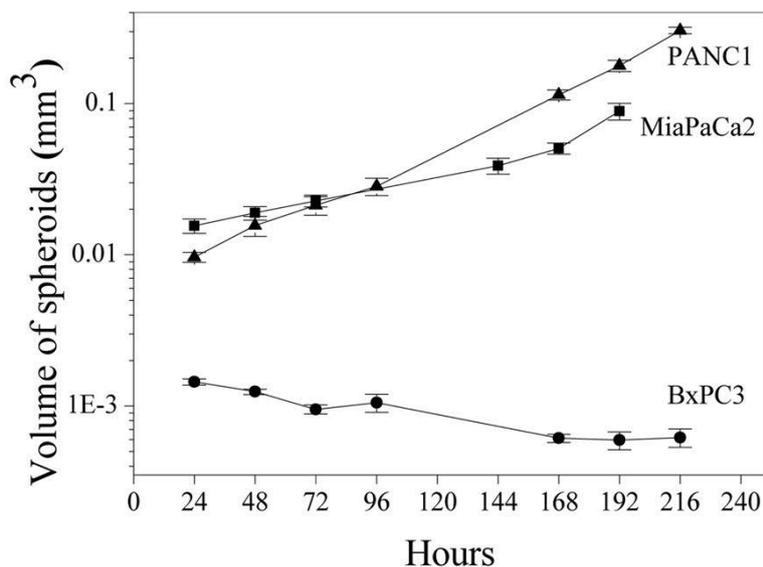


Figura 36: Accrescimento volumetrico degli sferoidi composti dalle linee cellulari PANC1, MiaPaCa2, BxPC3 tutte appartenenti a diverse tipologie di tumori pancreatici.

Inoltre, in base ai dati calcolati ed alle stime sul valore di impacchettamento, il volume dello sferoide, pari a $54,4 \times 10^6 \mu m^3$, è risultato in linea con i valori di crescita volumetrica di sferoidi di cellule pancreatiche tra le 96 e le 120 ore di cultura cellulare, come riportato in Figura 36, in cui è rappresentato l'andamento volumetrico dello sferoide PANC1 nel tempo [44].

2.6 INTRODUZIONE ALLE TECNICHE DI INDENTAZIONE PER I SOFT TISSUES

I test di durezza sono uno strumento utile per valutare la capacità del materiale di resistere all'indentazione. Sono considerati veloci, facili e non distruttivi. Una forza viene applicata a un penetratore che preme su una superficie e viene misurata la profondità di penetrazione. La forma e il materiale del penetratore possono essere scelti a seconda del tipo di materiale che deve essere testato. Tuttavia, la dimensione della sonda deve essere inferiore al livello della scala di lunghezza corrente del campione misurato. [48]

L'indentazione è diventata una tecnica emergente per testare materiali biologici e morbidi, perché consiste in una misurazione locale, che consente la valutazione dell'eterogeneità del campione, non richiede una grande quantità di materiale e un'estesa preparazione del campione.

Un test di indentazione inizia quando la sonda viene tenuta sopra il campione, senza toccarlo, quindi si avvicina, raggiunge il materiale e inizia a comprimere la sua superficie. La forza e la profondità di penetrazione sono registrate da un sensore che permette di controllare la velocità e la profondità desiderata. Quando il penetratore è molto vicino al campione, possono essere registrate forze negative, a causa delle forze di interazione di Van der Waals che attraggono la punta alla superficie del campione. [49]

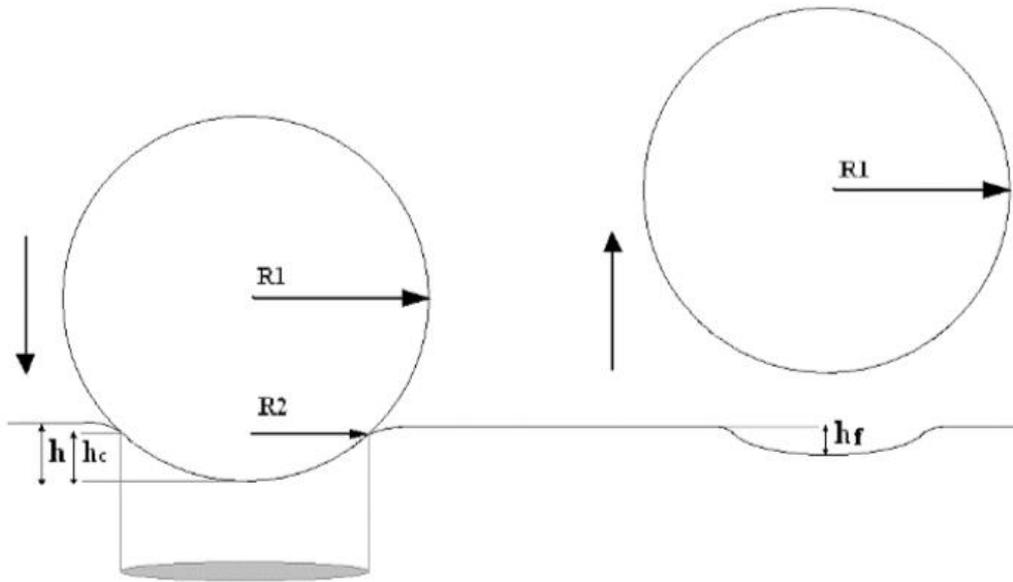


Figura 37: Schematizzazione di un indentatore sferico e dell'impronta lasciata sul campione

I biomateriali morbidi vengono solitamente testati utilizzando una punta smussata, come quella sferica o cilindrica, che ha un'area di contatto più ampia rispetto a una punta a piramide o tronco conica. Quest'ultime, infatti, possono danneggiare il campione a causa del suo basso modulo elastico e può portare a valori diversi per il test ripetitivo: una misura con una punta smussata può essere considerata come una media di più misure con una sonda più acuta. Per quanto riguarda le punte smussate, quella sferica ha il vantaggio di evitare un'elevata concentrazione di sollecitazioni al perimetro di contatto (che invece avviene con una punta cilindrica) ma, ha l'inconveniente di un'area di contatto non costante. [49]

2.6.1 PROGETTAZIONE DI UNA PIATTAFORMA PER INDENTAZIONE DI SOFT-TISSUES.

Dopo questa breve introduzione all'indentazione dei soft materials si presentano le prove sperimentali effettuate in laboratorio per mezzo di una piattaforma di indentazione capace di generare spostamenti micrometrici attraverso ghiera di controllo, progettata appositamente per l'estrazione delle forze risultanti durante un test di indentazione ed il successivo calcolo del modulo elastico del provino. In particolare si è scelto di usare dell'agarosio CSL-AG500 che è comunemente usato come terreno di cultura per l'accrescimento degli sferoidi cellulari che saranno successivamente utilizzati per la sperimentazione con LIUS. Nonostante sia già noto in letteratura il valore di modulo elastico di questo gel alle diverse concentrazioni si è ritenuto utile avere a disposizione una piattaforma per poter caratterizzare anche altri eventuali gel per la creazione di scaffold dedicati per studi futuri. I test come descritto di seguito hanno permesso di estrarre una curva di andamento del modulo elastico al variare della concentrazione di agarosio presente nel provino.

Sono state prodotte soluzioni all'1,5%, 1% e 0,5% aggiungendo rispettivamente 1,5, 1 e 0,5 grammi di polvere di agarosio CSL-AG500 in 10 ml di acqua (assumendo che la polvere fosse agarosio al 100%). Quando si dissolve subisce diversi passaggi: dispersione, idratazione e fusione. Durante la dispersione le particelle si separano l'una dall'altra senza aggregarsi, mentre l'idratazione consiste nel circondare la polvere di agarosio con una soluzione. Infine, la fusione può essere eseguita in una piastra calda o in un microonde, portando l'acqua a temperatura di ebollizione, per garantire la completa dissoluzione dell'agarosio, poiché la sua temperatura di fusione (per l'agarosio standard) è di 93 ° C. [50] Seguendo la procedura standard, la suddetta quantità di acqua è stata riscaldata in un becher metallico su una piastra calda fino a raggiungere la temperatura di ebollizione. Successivamente, il contenitore è stato rimosso dalla piastra calda ed è stata aggiunta la polvere di agarosio. Sono seguiti cinque minuti di miscelazione lenta, per evitare l'incapsulamento di bolle d'aria. Quando la soluzione ha raggiunto i 50-60 ° C era pronta per essere colata in stampi di silicone cilindrici, con un diametro di 40 mm e un'altezza di 20 mm. Dopo la completa solidificazione - il tempo variava in base alla percentuale di agarosio - i campioni sono stati rimossi dagli stampi e posti su piastre di Petri.

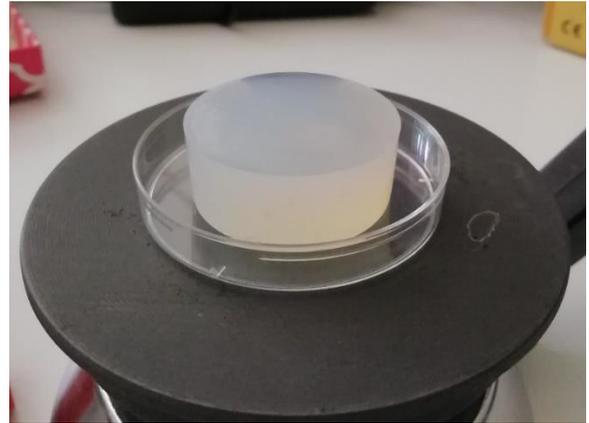


Figura 38: a) Stampo in silicone per la colatura dell'agarosio fuso; b) Campione di agarosio per i test di indentazione

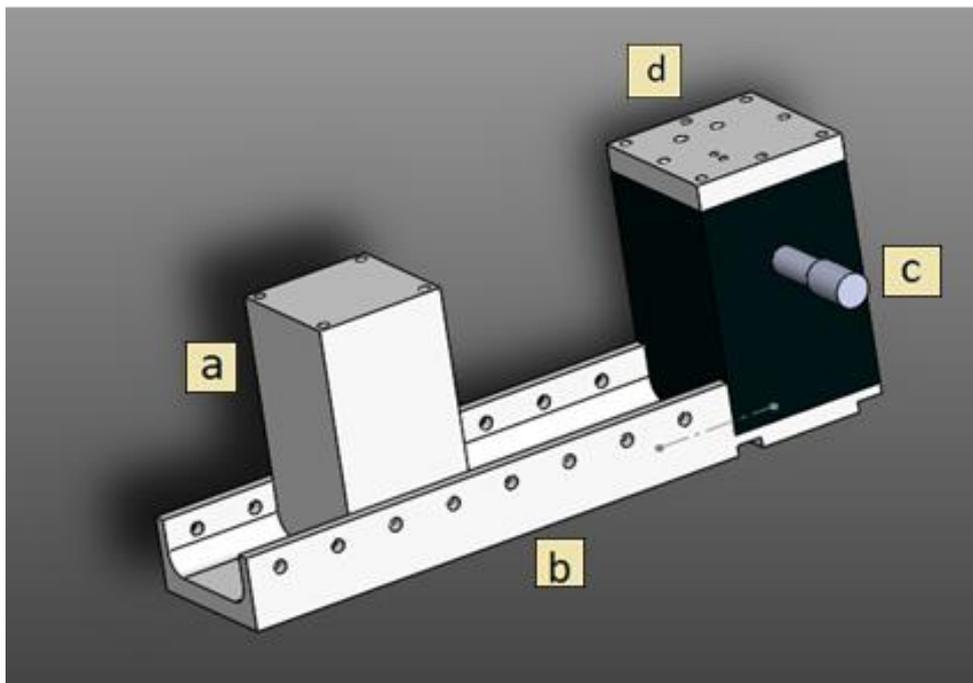


Figura 39: Modello 3D del sistema di indentazione: piattaforma di supporto campione (a), guida lineare regolabile per l'uso di cantilever diversi (b), piattaforma di ancoraggio del cantilever sensorizzato con cella di carico (d), ghiera di regolazione asse Z di indentazione (c).

Durante tutte le prove i campioni sono stati posti sul porta campioni (Figura 39, componente a), mentre la cella di carico con cantilever posizionato su di essa è stata fissata sulla piastra (Figura 39,

componente d) mediante bulloni M3. Attraverso la ghiera di controllo si attua il processo di indentazione.

La cella di carico è stata programmata utilizzando il software Arduino, che ha permesso la calibrazione del peso posto all'estremità della cella di carico e la rilevazione della forza applicata. Il sistema è molto sensibile alle vibrazioni esterne, di conseguenza è stato interposto sul piano di lavoro uno smorzatore in materiale polimerico per ridurre gli errori di misura.

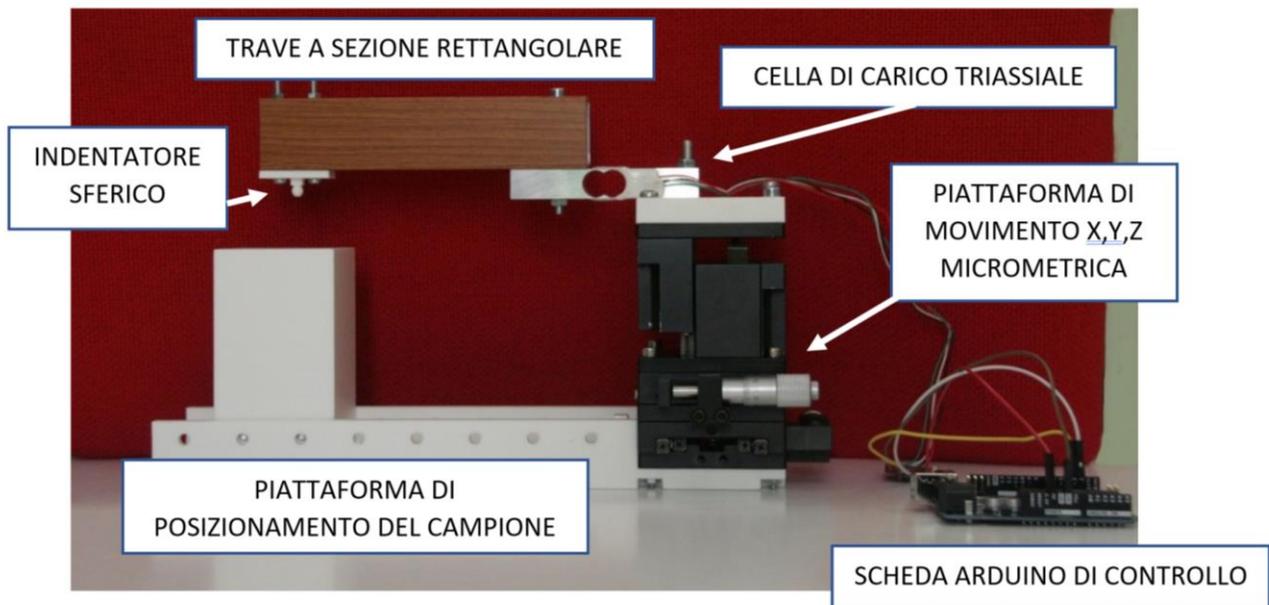


Figura 40: Sistema di indentazione progettato e calibrato per le prove sperimentali

Sono stati preparati nove campioni di agarosio: tre con l'1,5% di agarosio, tre con lo 0,5% e tre con l'1%.

Gli esperimenti di indentazione sono stati condotti a una velocità di 0,6 mm / min.

La cella di carico ha registrato la forza generata dal contatto della punta con il campione, mentre la profondità di penetrazione è stata calcolata come differenza tra l'abbassamento della cella di carico sul tavolino e la deflessione del cantilever. La deflessione del cantilever f è stata calcolata considerandola come una trave a sbalzo con un carico puntuale all'estremità libera, e utilizzando la seguente equazione:

$$f = \frac{P l^3}{E I} \quad 22.$$

Gli esperimenti sono stati eseguiti con uno spostamento fino a 1 mm, utilizzando un penetratore sferico con un diametro di 5 mm.

Gli esperimenti di indentazione sono semplici e adatti per la determinazione delle proprietà dei materiali sia locali che globali, in base alla dimensione della punta. Per i materiali morbidi è stata scelta una punta sferica, in quanto è lo strumento più comune utilizzato per testare i tessuti molli; infatti una punta acuminata può danneggiare il campione a causa del suo basso modulo elastico. È stato scelto il modello di contatto Hertz in quanto utilizza la porzione di carico della curva ed è più adatto per campioni morbidi in quanto la porzione di carico è più rappresentativa delle proprietà del materiale vergine e restituisce valori costanti del modulo elastico, indipendentemente da lo spostamento e la forza. Invece, l'uso della curva di scarico (metodo Oliver-Pharr) restituisce risultati non costanti con differenti spostamenti o carichi massimi. Tuttavia, il modello Hertz presuppone un comportamento lineare elastico e isotropo del materiale e l'assenza di attrito tra la punta del penetratore e la superficie del campione. Tali ipotesi potrebbero diventare fonte di errore, alterando i risultati. Comunque, la caratterizzazione di un comportamento viscoelastico richiederebbe una strumentazione più accurata e diversi test, al fine di valutare la velocità di scorrimento e il livello di rilassamento da sollecitazione del materiale. Infine, la viscoelasticità del campione potrebbe essere trascurata se il ceppo è molto piccolo. Il carico F è espresso come:

$$F = \frac{4}{3} E_{eff} R^{\frac{1}{2}} h^{\frac{3}{2}} \quad 23.$$

dove R indica il raggio del penetratore sferico, h rappresenta la profondità di penetrazione ed E_{eff} il modulo elastico composito del provino e del penetratore, dato da:

$$\frac{1}{E_{eff}} = \frac{1-\nu^2}{E} + \frac{1-\nu'^2}{E'} \quad 24.$$

Dove E rappresenta il modulo elastico del penetratore ed E' il modulo elastico del campione. Il rapporto di Poisson è stato stimato pari a 0,5 per ciascuno dei tipi di agarosio esaminati. In caso di materiali morbidi, l'equazione precedente può essere approssimata come:

$$\frac{1}{E_{eff}} \approx \frac{1-\nu^2}{E} \quad 25.$$

Di conseguenza, il modulo elastico campione si ottiene tramite la seguente equazione:

$$E = \frac{3(1-\nu^2)F}{4R^{\frac{1}{2}} h^{\frac{3}{2}}} \quad 26.$$

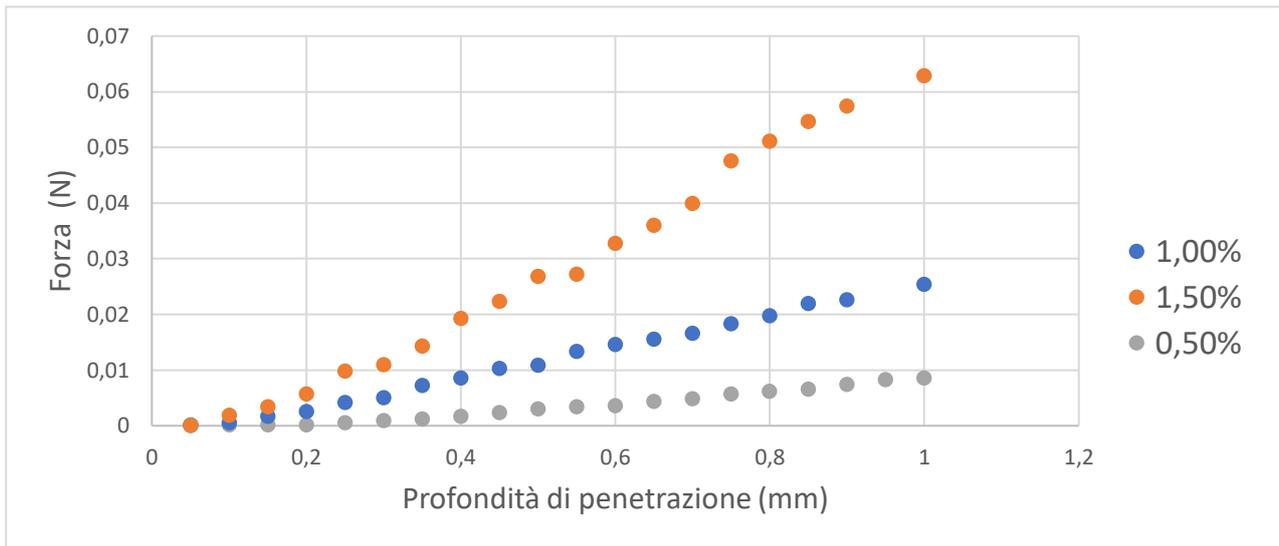


Figura 41: Diagramma di forza vs profondità di penetrazione di tre campioni con diversa concentrazione di agarosio.

In figura 41, sono riportati tre esempi di una curva forza-penetrazione. Si vede chiaramente il comportamento del modulo elastico, in quanto proporzionale alla resistenza ed inversamente proporzionale alla profondità di penetrazione, che influenzano il modulo elastico più che la resistenza. I campioni con concentrazione dell'1,5%, 1,00% di agarosio sono stati testati nove volte ciascuno, mentre i campioni con 0,5% di agarosio sono stati testati sei volte. I valori medi del modulo elastico per i tre diversi tipi di campioni, da quelli con concentrazione più alta a quelli più bassi, sono $25.01 \pm 4,09$ KPa, $9,10 \pm 1,77$ KPa e $3,15 \pm 0,83$ KPa.

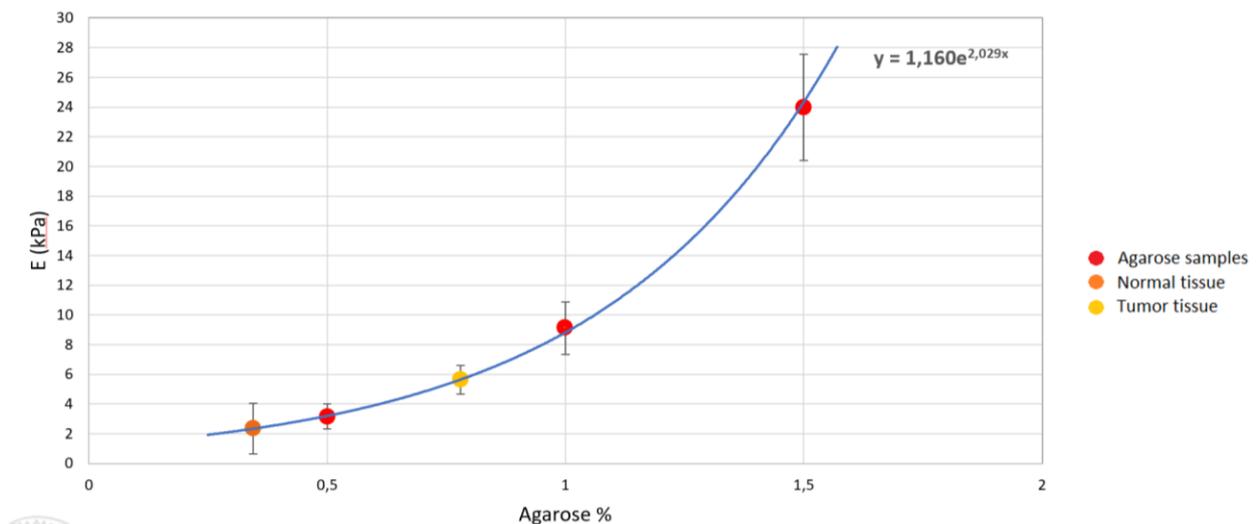


Figura 42: Modulo elastico del pancreas e gel di agarosio a diverse concentrazioni.

In Figura 42, sono riportati i valori con la loro deviazione standard a confronto con il modulo elastico del tumore pancreatico.

Studi sulle proprietà meccaniche del gel di agarosio confermano che il modulo elastico può variare da 2 KPa per basse concentrazioni di agarosio, come 0,5% [49][50], a 15 KPa per concentrazione di agarosio 1% [51][52], a 110/120 per agarosio 3% [52][53].

2.7 MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA (AFM)

La microscopia a forza atomica è una tecnica ben nota ed in letteratura come già riportato nel capitolo precedente ci sono molti studi che la utilizzano per caratterizzare la topografia superficiale di campioni biologici; più ridotta è invece la trattazione che descrive come approcciare il processo di indentazione con la successiva estrazione dei moduli elastici dei tessuti con il loro relativo comportamento non lineare.

In Figura 43 si riporta lo schema di funzionamento di un Microscopio a Forza Atomica, per meglio comprendere le curve che sono state estratte dalle analisi condotte. In particolare il campione viene posizionato su una piattaforma in grado di effettuare dei micro-spostamenti mediante i processi di compressione e contrazione di cristalli piezoelettrici posti al di sotto di essa; una punta estremamente sottile, realizzata tramite processi di elettroerosione viene portata in contatto o ad una distanza prefissata con il campione. Esistono due modalità di scansione, la prima che è stata usata è chiamata modalità a non contatto, nella quale il cantilever viene fatto oscillare alla sua frequenza propria e grazie ad un puntatore laser ed a un detector viene misurate la variazione dell'ampiezza di oscillazione dovuta alle forze di interazione di Wan Der Waals con il campione: in questo modo è possibile effettuare una vera e propria mappa topografica della superficie senza alterare o contaminare il campione stesso. Nella seconda modalità, la punta entra in contatto con il campione e l'output del processo è una curva che descrive le forze di reazione esercitate dal campione all'aumentare della penetrazione della punta, quindi un vero e proprio processo di indentazione che sfrutta la rigidità del cantilever per estrapolare un valore di modulo elastico del campione ed il suo comportamento non lineare.

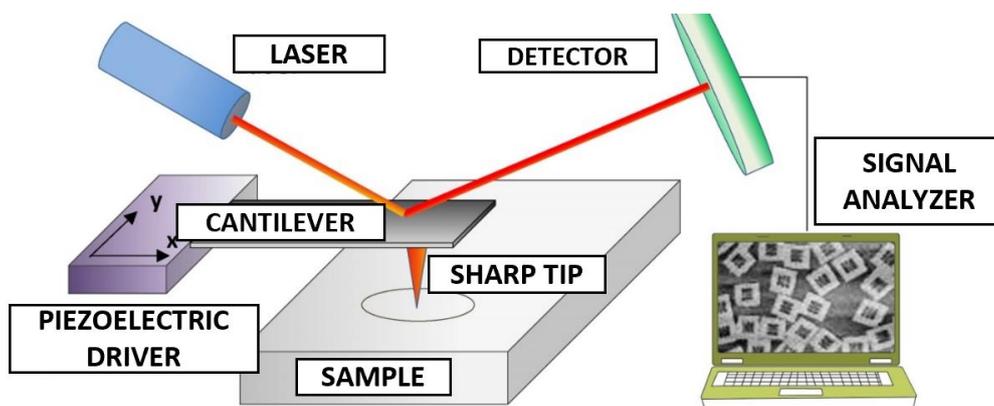


Figura 43: Schema di funzionamento di un sistema AFM;

2.7.1 ACQUISIZIONE IMMAGINE IN MODALITA' NON A CONTATTO

Nel processo di preparazione del microscopio è essenziale selezionare la punta con le caratteristiche idonee al tipo di acquisizione che si vuole ottenere: ogni punta ha caratteristiche diverse, viene misurata la frequenza di risonanza di oscillazione della singola punta che sarà all'interno di un range. Le immagini devono essere analizzate criticamente perché è molto facile trovare artefatti dovuti a materiale proveniente dal campione o dall'atmosfera esterna che può attaccarsi alla punta e condizionare la scansione. Bisogna controllare che nell'immagine non ci siano delle features che si ripetono, se sono presenti features ripetitive (es. sdoppiamento dell'immagine) è un sintomo della presenza di problemi che riguardano la punta ed in questi casi bisogna cambiare punta e rifare l'immagine.

La punta della sonda dello strumento ha un raggio di curvatura che generalmente non supera le poche decine di nanometri ed il materiale con cui è realizzata è la stessa del cantilever ossia in Silicio. Inoltre il cantilever è ricoperto da un film d'oro per permettere la riflessione del raggio laser ed una lettura ottimale senza effetti diffrattivi del raggio. Solidamente alla base si trova uno specchio che consente di verificare il corretto posizionamento della punta e, attraverso la presenza di un pattern di interferenza, si riscontra l'allineamento del laser sul tip che in seguito permette di registrare la posizione finale tramite software.

Successivamente al posizionamento del campione e all'immobilizzazione del vetrino si porta in posizione lo strumento: è presente un motore passo-passo che permette di muoversi lungo l'asse z a seconda dello spessore substrato. Il primo posizionamento si effettua manualmente, successivamente attraverso un sistema di ghiera si registra, attraverso un microscopio ottico posto lateralmente al campione, la posizione di partenza delle analisi per massimizzare il segnale e per ridurre i segnali di

disturbo della misura. In seguito si mette in risonanza la punta per eseguire l'approccio, la forma della risonanza dovrebbe essere molto simile ad una gaussiana come mostrato in Figura 44.

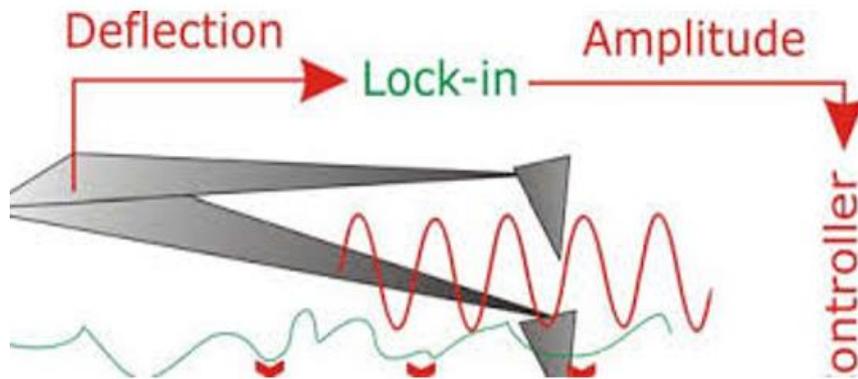


Figura 44: Oscillazione propria della punta e interazione con il campione sottostante.

Si può agire su alcuni parametri per sollecitare l'oscillazione della frequenza di risonanza, ovvero la misura dell'intensità dell'oscillazione deve essere compresa tra 9 e 12 nA per avere immagini migliori, quindi si agisce sulla tensione applicata per riportare i valori all'interno del range. Iterativamente si ripete la procedura fino ad ottenere una curva gaussiana. Nella fase successiva si effettua il "landing" e si osserva il segnale in discesa seguito da un picco che conferma l'avvenuto contatto con il campione: in questa fase si possono selezionare la risoluzione di interesse, che in genere è mantenuta 512x512, la dimensione della zona da scansione, frequenza di campionamento e la velocità di scansione.

Durante la sessione sperimentale, con questa tecnica, sono state acquisite 10 aree da 100 μm x 100 μm da 10 sferoidi diversi per poi confrontarle con la modalità di scansione a contatto che sarà discussa nel prossimo paragrafo e dalla quale si possono estrarre molte più informazioni sul campione in analisi.

2.7.2 ACQUISIZIONE IMMAGINE E MISURE DI FORZA IN MODALITA' A CONTATTO

La modalità a contatto è l'unica che permette di procedere con l'indentazione del campione dopo la scansione superficiale per strisciamento della punta sul campione. La qualità della scansione con questa tecnica può non essere ottimale con campioni molto delicati in quanto la punta può lasciare dei solchi che compromettono l'integrità del campione biologico; solo dopo alcuni test sono stati individuati i parametri che hanno permesso di effettuare una scansione a contatto senza danneggiare il campione. Con questo metodo sono state caratterizzate 10 aree di $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ da 10 sferoidi diversi e per ogni area scansionata sono stati selezionati fino ad un massimo di 6 punti corrispondenti alle zone più nitide e senza segni di strisciamento, ossia in prossimità delle cellule che compongono l'anello esterno come viene mostrato in figura 45.

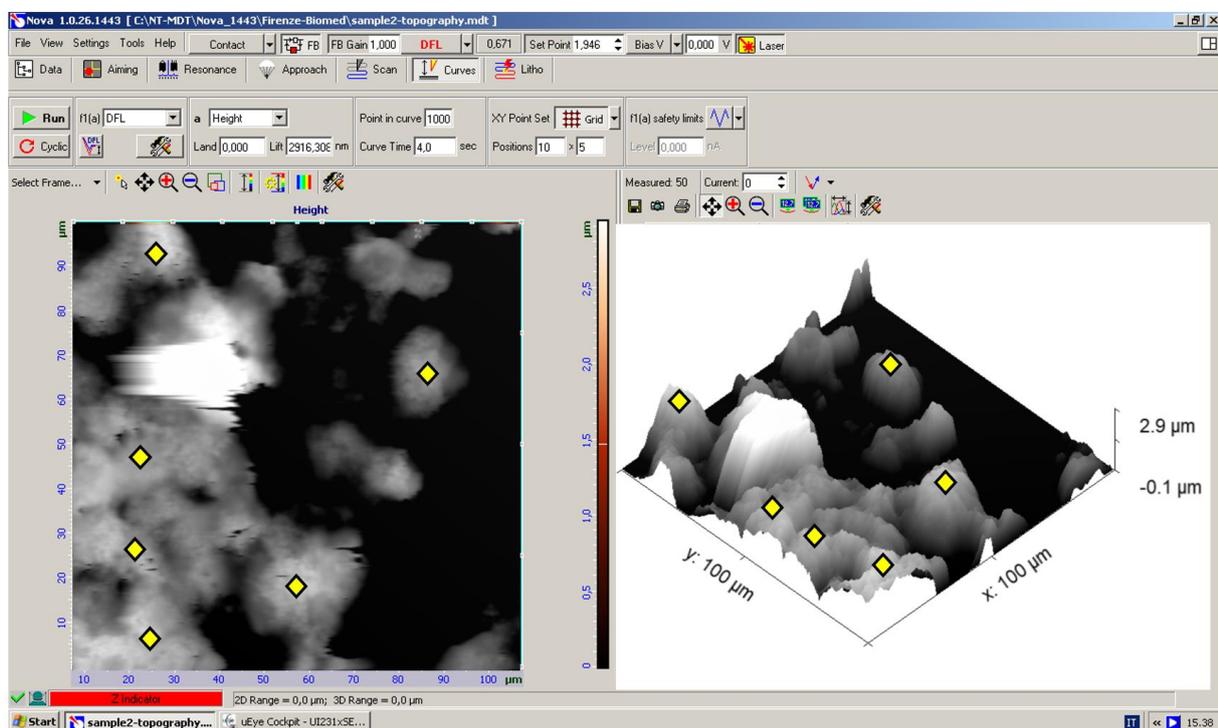


Figura 45: Area Scansionata in modalità a contatto e definizione dei punti di interesse per il processo di indentazione

Lavorando in contatto la punta non oscilla quindi non bisogna settare la risonanza. L'analisi della forza restituisce un segnale in corrente (nanoAmpere), che in seguito tramite uno script si potrà convertire in forza (nanoNewton). La punta si posiziona sulla zona da indentare seguendo

l'ordine di selezione dei punti ed al termine della prova si ottiene, per ogni processo di indentazione, il grafico della forza con le due curve in approccio e in rilascio come mostrato in figura 46b. La dinamica della microindentazione è molto complessa e varia profondamente in base alla tipologia del campione, nella figura 46a sono rappresentati in modo schematico i parametri geometrici che il software dell'AFM deve elaborare per restituire un dato affidabile.

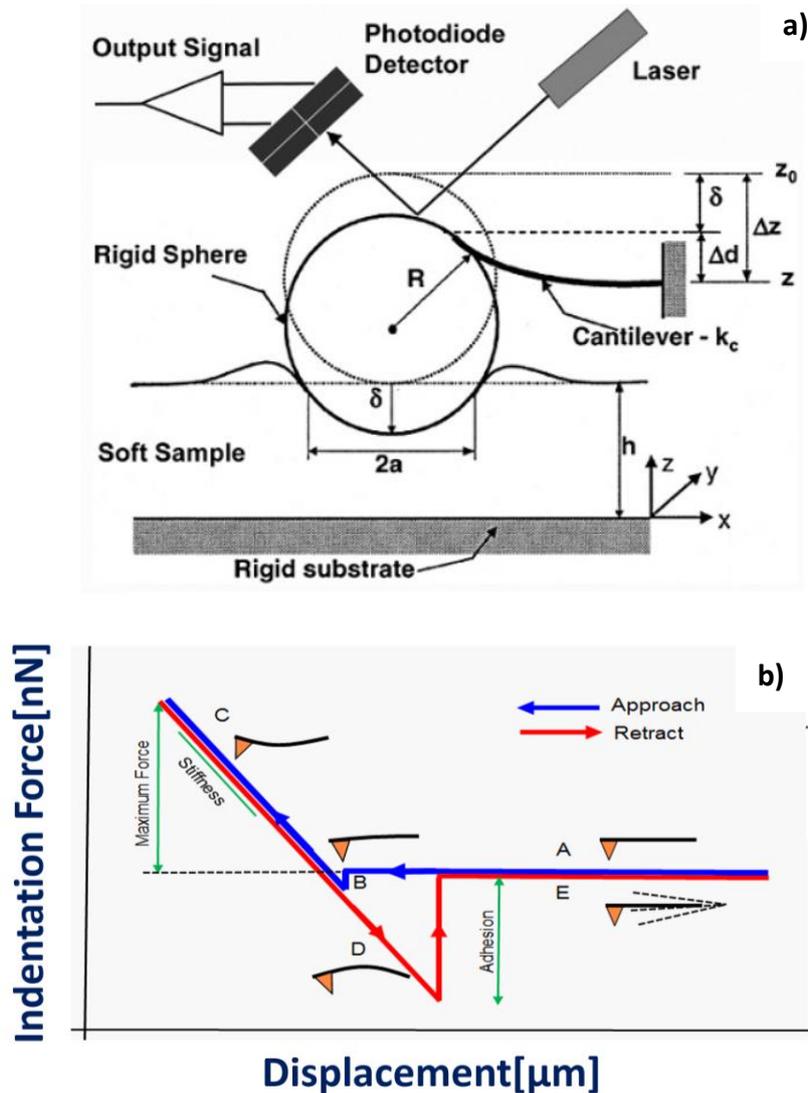


Figura 46: a) Schema delle deformazione generate da un indentatore cilindrico e dei parametri che influenzano le curve acquisite b) Grafico riepilogativo sul comportamento atteso per un processo di microindentazione di un campione biologico con AFM.

Nel grafico mostrato in figura 46 (b) viene descritto il ritorno di forza misurato seguendo la storia della prova in dettaglio: nel tratto da A ad E la punta si avvicina al campione lungo l'asse z; nel punto B le forze di interazione con il campione la fanno aderire e portano ad una lettura negativa del valore di forza facendo flettere il cantilever; da questo momento in poi il software setta la velocità di deformazione costante ad un valore definito dall'utente fino al raggiungimento del massimo

spostamento fissato lungo la z, rappresentato dal punto C; al raggiungimento di tale valore la punta si ritira lungo lo stesso asse z e con le stesse modalità descritte restituendo un andamento di forza che segue la linea rossa nel grafico. In particolare si può notare che il fenomeno di adesione, individuato durante la fase di recupero della punta, risulta più evidente con campioni ad elevata deformabilità ossia gel o tessuti biologici: questo effetto è molto meno accentuato in campioni cristallini o superfici completamente asciutte.

2.7.1 ANALISI DELLE CURVE ED ELABORAZIONE DEI DATI

La prima analisi condotta sulle immagini acquisite in modalità non contact ha permesso di riscontare i valori dimensionali e di densità superficiale dell'anello esterno. Utilizzando il software di ricostruzione 3D Gwyddion sono state analizzate le 10 aree da 100x100 um estratte dai 10 sferoidi e per ogni aree sono state tracciate i segmenti corrispondi ai diametri delle cellule che sono ben individuabili come contorni chiusi ed è stato acquisito poi estratto il diametro medio cellulare.

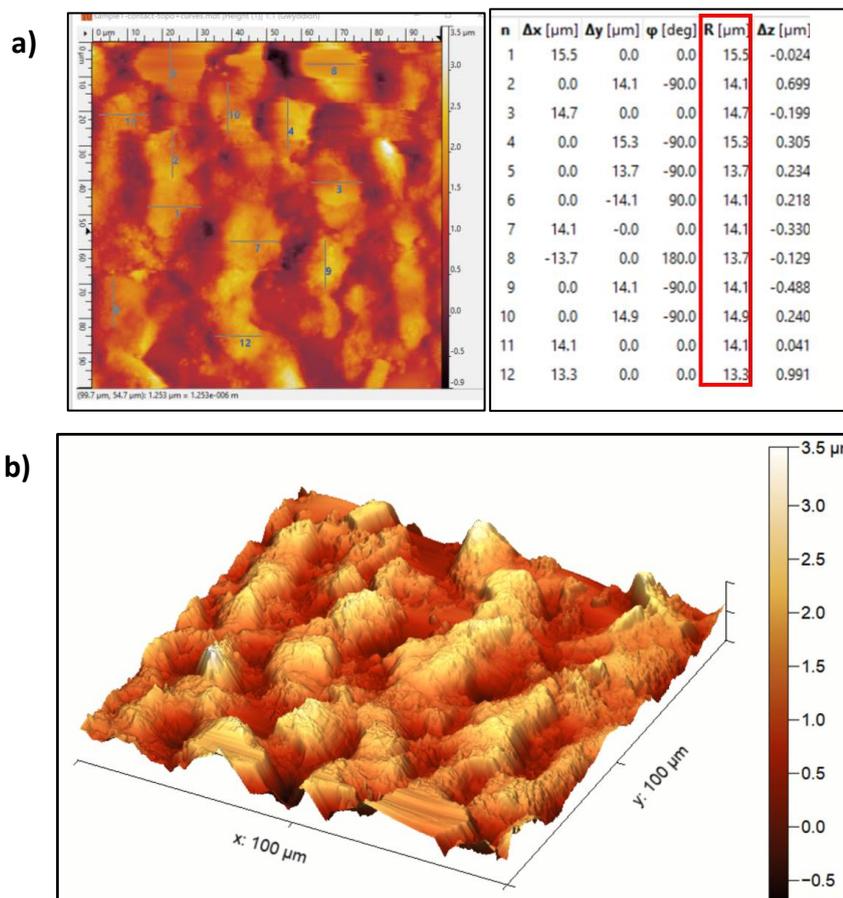


Figura 46: a) Rilievo topografico in modalità non a contatto e definizione dei diametri medi delle cellule che compongono i sferoidi; b) ricostruzione tridimensionale della superficie dello sferoide.

I dati estratti da questa prima analisi confermano quelli ottenuti con il precedente metodo di indagine con microscopio a confocale e successiva elaborazione con MatLab. Possiamo quindi riassumere nella figura 47 tutti i dati fino ad ora estrapolati e confermati dalle due metodologie che sono validi per sferoidi tumorali composti da cellule Panc-1 allo stadio di accrescimento di 96 ore.

$\bar{D}_{cell} = 15.2 \pm 1 \mu m$	Cell mass = 3,5 ng
Core Density:	$1.625 g/cm^3 = 464 * 10^6 cells/cm^3$
External Ring Density:	$1.117 g/cm^3 = 319 * 10^6 cells/cm^3$
Bone	1.710 - 2.050 g/cm ³
Water	1.000 g/cm ³
Blood	1.055 g/cm ³
Fat	0.910 g/cm ³
Muscle	1.110 g/cm ³
«Panc 1»	1.117 - 1.625 g/cm ³

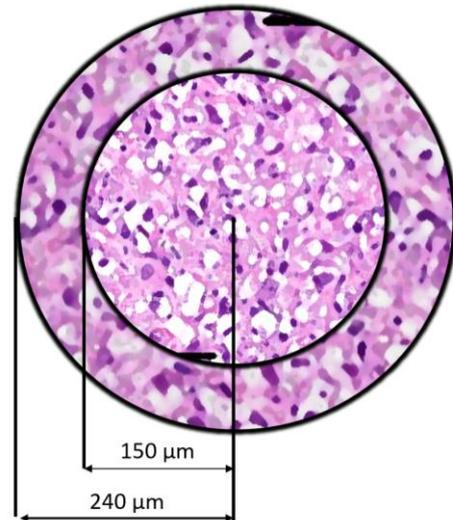


Figura 47: Riassunto delle proprietà sino ad ora individuate sugli sferoidi Panc-1

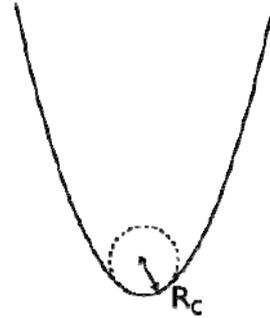
Si procede quindi con l'analisi dei dati derivanti dal protocollo messo a punto per la microindentazione del campione biologico. Sono stati acquisite 300 curve, corrispondenti a 10 punti di scansione diversi per ogni area 100x100 μm appartenente a 10 diversi sferoide di Panc-1 e su ogni punto sono state eseguite 3 prove a 3 velocità di indentazione diverse per caratterizzare il comportamento viscoelastico dello sferoide. Si riporta una curva di esempio nella figura 48 in cui si individua in modo chiaro la curva di approccio e di ritorno della punta. In particolare viene utilizzato il protocollo indicato dal software JPK: a seconda della forma della punta utilizzata per le prove di indentazione cambia il metodo di calcolo che è effettuato dal software per restituire l'andamento dei moduli elastici corrispondenti alle prove selezionate:

3. Forma Parabolica

$$F = \frac{4\sqrt{R_c}}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \delta^{3/2}$$

$$a = \sqrt{R_c \delta}$$

27.



2. Forma Sferica

$$F = \frac{E}{1-\nu^2} \left[\frac{a^2 + R^2}{2} \ln \frac{R+a}{R-a} - aR \right]$$

$$\delta = \frac{a}{2} \ln \frac{R+a}{R-a}$$

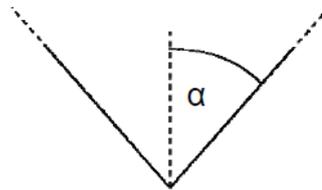
28.

1. Forma Conica

$$F = \frac{E}{1-\nu^2} \frac{2 \tan \alpha}{\pi} \delta^2$$

$$a = \frac{2 \tan \alpha}{\pi} \delta$$

29.



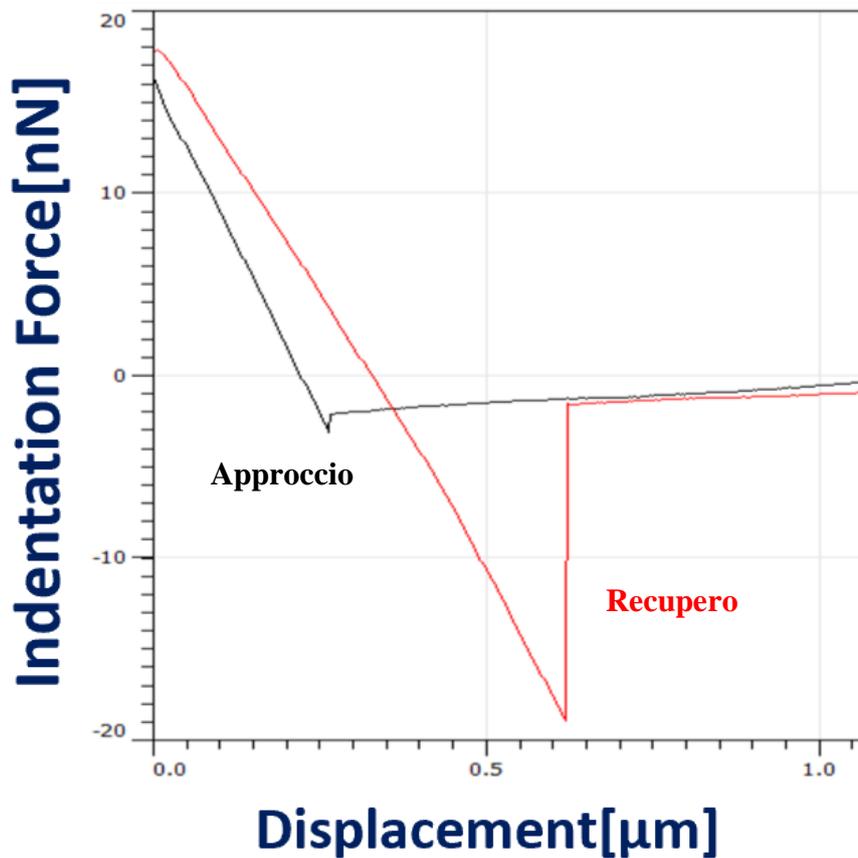


Figura 48: Esempio di una delle 300 curve derivate dal processo di indentazione del campione PANC-1.

Come indicato anche nel manuale del software della JPK Instrumetns l'andamento del modulo elastico durante la prova può variare in modo considerevole ed è quindi essenziale associare l'andamento corretto per filtrare le curve che non sono quindi di interesse per la costruzione del modello agli elementi finiti. In particolare si riportano in figura 49, 3 possibili situazioni di indentazione che determinano diversi comportamenti e quindi diversi andamenti della curva.

Nel primo caso l'indentazione avviene in modo corretto e la tecnica AFM ci permette di caratterizzare il valore del modulo elastico della cellula al variare della profondità di indentazione e alla velocità di indentazione;

nel secondo caso, viene caratterizzato il comportamento del citoplasma che però tende ad essere influenzato dal substrato sottostante restituendo al termine della prova un modulo elastico superiore rispetto a quello del nucleo della cellula; infine nell'ultimo caso l'andamento di E è molto simile al primo caso con la differenza che a seguito della perforazione della membrana citoplasmatica

l'indentatore incontra il substrato rigido di supporto alterando la misurazione. Rimane quindi evidente che il comportamento da prendere in considerazione sia il primo illustrato che ci permette di acquisire i valori di modulo di Young corretti al variare della velocità di indentazione.

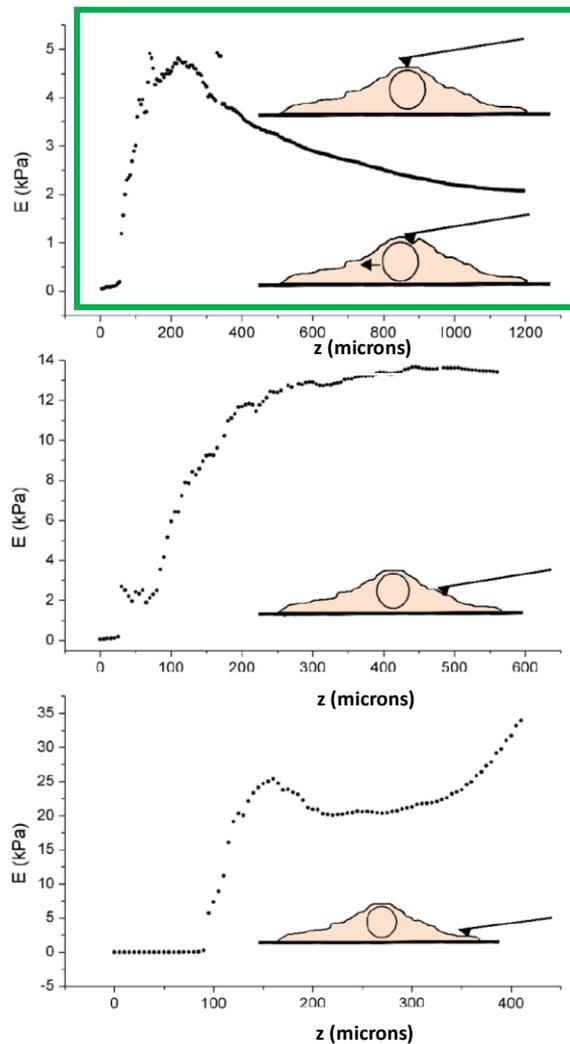


Figura 49: Diversi andamenti delle curve di indentazione al variare del punto di indentazione, in verde evidenziato il comportamento idoneo alla caratterizzazione cellulare.

A fronte di quanto fino ad ora discusso delle 300 curve acquisite, solo 150 curve hanno mostrato un comportamento conforme all'indentazione del nucleo cellulare: 38 curve corrispondenti alla velocità di indentazione di 1,75 $\mu\text{m/s}$, 44 curve corrispondenti alla velocità di indentazione di 1,25 $\mu\text{m/s}$ e 68 curve corrispondenti alla velocità di indentazione 0,75 $\mu\text{m/s}$. Da queste considerazioni risulta evidente la complessità sperimentale legata ad un processo di microindentazione di tessuti biologici in fase semifluida.

Seguendo quindi le indicazioni del manuale, viene introdotta la relazione tra la forza applicata sul campione dalla microleva e l'indentazione della punta nel campione, ovvero quanto la punta penetra il campione lungo la direzione dell'asse Z, questa è una legge di potenza del tipo:

$$F = a(x - x_0)^\sigma \quad 30.$$

Dove a è un termine dipendente dalla forma della punta, dal modulo elastico (E) della cellula e dal coefficiente di Poisson (ν); σ è un termine adimensionale che dipende dalla forma della punta, x_0 corrisponde invece al valore dell'indentazione quando la punta è a contatto e mantiene un'intensità della forza applicata pari al SetPoint. Secondo quanto indicato per le punte a forma di cono la F vale:

$$F = \frac{E}{1-\nu^2} \frac{2\tan\alpha}{\pi} (x - x_0)^2 \quad 31.$$

Dove α è il semi angolo del cono, quindi otteniamo la relazione del modulo elastico del campione per punto.

$$E = \frac{a\pi(1-\nu^2)}{2\tan\alpha} \quad 32.$$

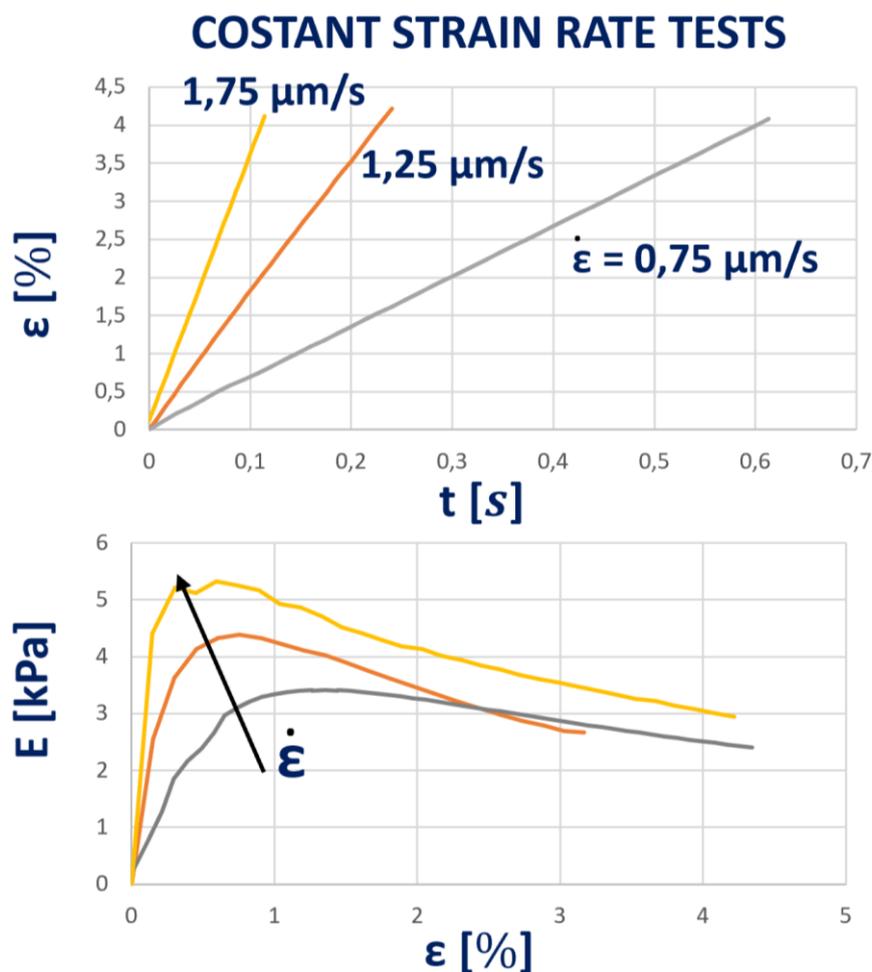


Figura 50: Curve caratteristiche dei test eseguiti a velocità di deformazione costane e relative curve del comportamento non lineare delle cellule della linea PANC-1.

Il software JPK associato all' AFM ha permesso quindi di estrarre i valori delle curve di comportamento in funzione dello stress e del tempo di esecuzione delle prove come media di tutte le curve sperimentali: queste curve sono essenziali per poter procedere con la definizione del modello matematico da associare allo sferoide nel modello agli elementi finiti che sarà descritto nel prossimo capitolo. L'indagine AFM ha quindi permesso di confermare quanto era già stato fatto con la tecnologia del microscopio a fluorescenza: dimensione media delle cellule e densità cellulare sull'anello esterno. Questa metodologia aggiunge però una caratteristica essenziale riguardo il modulo elastico dell'anello esterno dello sferoide PANC-1 ed il suo comportamento sottoposto ad un carico di indentazione.

CAPITOLO 3

MODELLAZIONE AGLI ELEMENTI FINITI DI UN TRATTAMENTO LICU SU SFEROIDE TUMORALE

In questo capitolo vengono presentati i modelli matematici che sono maggiormente utilizzati in letteratura per lo studio dei materiali biologici e sarà descritta la procedura di preparazione del modello agli elementi finiti per le simulazioni delle onde ultrasonore che attraversano lo sferoide ed il mezzo in cui è fatto accrescere. Dai risultati di queste analisi si evidenzieranno le frequenze che potranno avere maggiore efficacia nell'indurre morte cellulare per accumulo di sollecitazioni nel tempo sulla membrana cellulare e sul nucleo dello sferoide.

3.1 COMPORTAMENTO CELLULARE IPERELASTICO

I modelli iperelastici sono quei materiali che hanno un comportamento non lineare se sottoposti a grandi deformazioni. Tali materiali che appartengono a questa categoria di modelli, subiscono un significativo cambiamento di forma all'applicazione di stati tensionali anche di bassa entità.

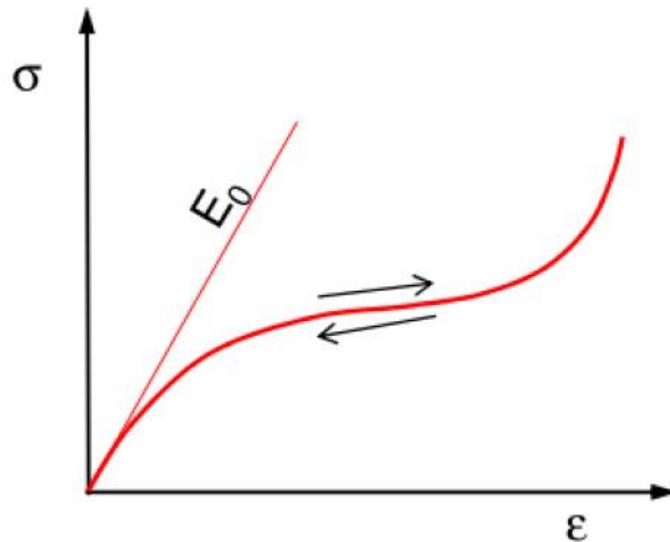


Figura 50: Confronto tra una curva lineare-elastica (E_0) e una curva iperelastica

Un materiale iperelastico (o Green elastic) è un tipo di modello costitutivo per materiali idealmente elastici, per i quali la relazione sforzo-deformazione deriva da una funzione di densità di energia di deformazione.

Come detto precedentemente, per molti materiali, il modello elastico lineare non è accurato nel descriverne il comportamento, ne è un esempio comune è la gomma. La quale relazione sforzo-deformazione può essere definita come elastica non lineare, isotropa, incompressibile e generalmente indipendente dalla velocità di deformazione. Quindi, l'iperelasticità fornisce uno strumento per modellare il comportamento sforzo-deformazione di tali materiali.

Le principali applicazioni di questo modello sono:

- Modellare il comportamento di polimeri o schiume polimeriche;
- Modellare elastomeri;
- Modellare tessuti biologici.

In particolare, in relazione allo scopo di questa tesi, ritengo utile considerare l'applicazione di tale modello per i tessuti biologici.

All'interno di questi modelli iperelastici, andrò ad approfondire nel dettaglio i seguenti modelli:

- Ogden
- Mooney-Rivlin

3.1.1 MOONEY RIVLIN

Il modello Mooney-Rivlin è un modello per materiali iperelastici, dove la funzione densità di energia di deformazione W è una combinazione lineare di due invarianti del tensore sinistro di deformazione di Cauchy-Green (\mathbf{B}).

Per un materiale incomprimibile, nel modello Mooney Rivlin, la densità di energia si ottiene:

$$W = C_1 (\bar{I}_1 - 3) + C_2 (\bar{I}_2 - 3) \quad 33.$$

Dove C_1 e C_2 sono costanti del materiale e \bar{I}_1 e \bar{I}_2 sono la prima e la seconda invariante del tensore unimodulare $\bar{\mathbf{B}} = \det(\mathbf{B})^{-1/3} \mathbf{B} = J^{-2/3} \mathbf{B}$, ovvero la somma degli autovalori della determinante della matrice di \mathbf{F} .

$$\bar{I}_1 = J^{-2/3} I_1, \quad I_1 = \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2, \quad 34.$$

$$\bar{I}_2 = J^{-4/3} I_2, \quad I_2 = \lambda_1^2 \lambda_2^2 + \lambda_2^2 \lambda_3^2 + \lambda_3^2 \lambda_1^2$$

Considerando \mathbf{F} il gradiente di deformazione e $J = \det(\mathbf{F}) = \lambda_1 \lambda_2 \lambda_3$. Nel caso in cui si tratti un materiale incomprimibile $J = 1$.

Il modello di Mooney-Rivlin è un caso speciale del modello generalizzato di Rivlin, anche chiamato modello iperelastico polinomiale, il quale ha una forma del tipo:

$$W = \sum_{p,q=0}^N C_{pq} (\bar{I}_1 - 3)^p (\bar{I}_2 - 3)^q + \sum_{m=1}^M D_m (J - 1)^{2m} \quad 35.$$

Dove $C_{00} = 0$ e C_{pq} sono le costanti del materiale relative alla risposta distorsiva e D_m sono costanti del materiale relative alla risposta volumetrica.

Per materiali comprimibili, il modello Mooney-Rivlin pone $N = 1, C_{01} = C_2, C_{11} = 0, C_{10} = C_1, M = 1$, quindi la funzione densità di energia di deformazione diventa:

$$W = C_{01}(\bar{I}_2 - 3) + C_{10}(\bar{I}_1 - 3) + D_1(J - 1)^2 \quad 36.$$

Se $C_{01} = 0$ si ottiene un solido Neo-Hookean, un caso speciale del solido Mooney-Rivlin.

Successivamente si introduce il Cauchy stress, quindi lo stress secondo Cauchy per un materiale compressibile iperelastico con uno stress generale è dato da:

$$\boldsymbol{\sigma} = \frac{2}{J} \left[\frac{1}{J^{2/3}} \left(\frac{\partial W}{\partial \bar{I}_1} + \bar{I}_1 \frac{\partial W}{\partial \bar{I}_2} \right) \mathbf{B} - \frac{1}{J^{4/3}} \frac{\partial W}{\partial \bar{I}_2} \mathbf{B} \cdot \mathbf{B} \right] + \left[\frac{\partial W}{\partial J} - \frac{2}{3J} \left(\bar{I}_1 \frac{\partial W}{\partial \bar{I}_1} + 2\bar{I}_2 \frac{\partial W}{\partial \bar{I}_2} \right) \right] \mathbf{I} \quad 37.$$

In relazione alla formula, per un materiale compressibile Mooney-Rivlin abbiamo che:

$$\frac{\partial W}{\partial \bar{I}_1} = C_1; \frac{\partial W}{\partial \bar{I}_2} = C_2; \frac{\partial W}{\partial J} = 2D_1(J - 1) \quad 38.$$

Perciò, sostituendo i valori (38) alla formula (37) otteniamo lo stress di Cauchy per materiali compressibili Mooney-Rivlin.

$$\boldsymbol{\sigma} = \frac{2}{J} \left[\frac{1}{J^{2/3}} (C_1 + \bar{I}_1 C_2) \mathbf{B} - \frac{1}{J^{4/3}} C_2 \mathbf{B} \cdot \mathbf{B} \right] + \left[2D_1(J - 1) - \frac{2}{3J} (\bar{I}_1 C_1 + 2\bar{I}_2 C_2) \right] \mathbf{I} \quad 39.$$

È possibile mostrare, attraverso dei passaggi algebrici, che la pressione interna del materiale è:

$$p := -\frac{1}{3} \text{tr}(\boldsymbol{\sigma}) = -\frac{\partial W}{\partial J} = -2D_1(J - 1) \quad 40.$$

Infine, l'equazione è spesso scritta con il tensore unimodale

$$\bar{\mathbf{B}} = J^{-2/3} \mathbf{B} \quad 41.$$

Quindi operando le sostituzioni si ottiene:

$$\boldsymbol{\sigma} = \frac{1}{J} \left[-p \mathbf{I} + 2(C_1 + \bar{I}_1 C_2) \bar{\mathbf{B}} - 2C_2 \bar{\mathbf{B}} \cdot \bar{\mathbf{B}} - \frac{2}{3} (\bar{I}_1 C_1 + 2\bar{I}_2 C_2) \mathbf{I} \right] \quad 42.$$

Per semplificare supponiamo di avere un materiale incomprimibile Mooney Rivlin, quindi $J = 1$, $p = 0$ e $\bar{\mathbf{B}} = \mathbf{B}$, la precedente espressione diventa:

$$\boldsymbol{\sigma} = 2(C_1 + I_1 C_2) \mathbf{B} - 2C_2 \mathbf{B} \cdot \mathbf{B} - \frac{2}{3} (I_1 C_1 + 2I_2 C_2) \mathbf{I} \quad 43.$$

Dal $\det(J) = 1$ il teorema di Cayley-Hamilton implica,

$$\mathbf{B}^{-1} = \mathbf{B} \cdot \mathbf{B} - I_1 \mathbf{B} + I_2 \mathbf{I} \quad 44.$$

Quindi il Cauchy stress può essere espresso come:

$$\boldsymbol{\sigma} = -p^* \mathbf{I} + 2C_1 \mathbf{B} - 2C_2 \mathbf{B}^{-1} \quad 45.$$

Con $p^* := \frac{2}{3}(I_1 C_1 - I_2 C_2)$.

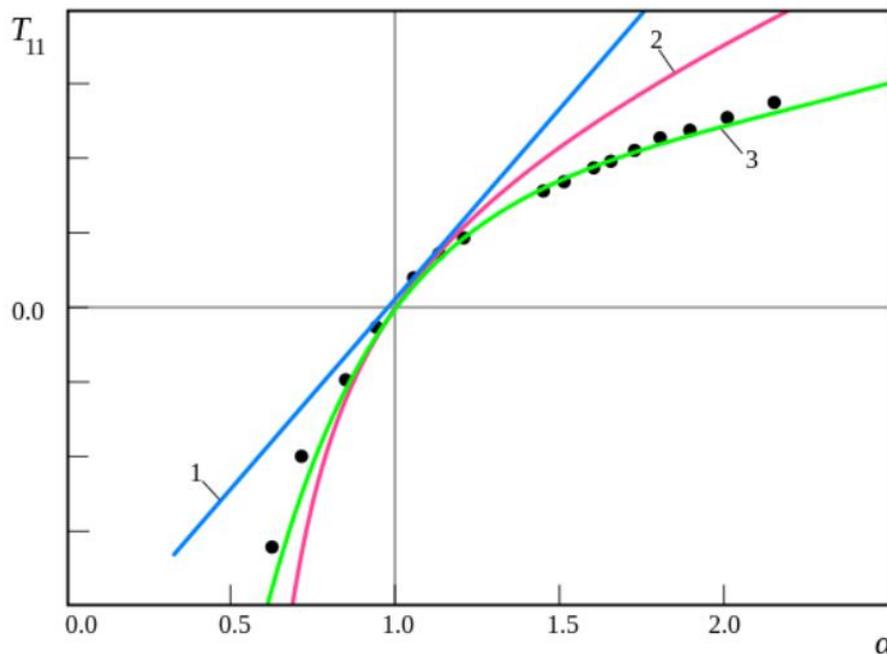


Figura 51: Comparazione sperimentale tra la legge di hooke (linea blu), Neo-hookean(linea rossa) e Mooney-Rivlin (Linea verde). . Nel grafico, abbiamo sulle ordinate la tensione di Cauchy stress che va da 0 a T_{11} ,cioè la tensione massima, e sulle ascisse α che è l'allungamento.

Il grafico della figura 51, mostra una comparazione tra tre leggi, cioè la legge di Hooke, la legge di Neo-Hookean e la legge di Mooney-Rivlin, supponendo di avere una singola semplice tensione (monoassiale), $\sigma_{22} = \sigma_{33} = 0$ e $\sigma_{11} = T_{11}$ e il materiale sia incomprimibile.

Con questa semplice semplificazione si può notare che la legge di Hooke si comporta in modo lineare, il Neo-Hookean all'aumentare della deformazione ha una riduzione della tensione e tende ad avere un valore asintotico. Nel caso Mooney-Rivlin si raggiunge prima il valore asintotico, perciò tale modello solitamente si adatta ai dati sperimentali meglio del modello Neo-Hookean, ma richiede una

costante empirica in più. Quindi a seconda del modello che viene utilizzato, è possibile trascurare l'effetto di allungamento del materiale considerando che viene fissato lo stress ad un certo livello.

Mooney-Rivlin è un modello semplificativo di quello di Rivlin, e viene usato per descrivere il comportamento di materiali come elastomeri e tessuti biologici

3.1.2 MODELLO DI OGDEN

Il modello di Ogden è un modello per materiali iperelastici usato per descrivere comportamenti sforzo-deformazione non lineari per materiali complessi come gomma, tessuti biologici e polimeri. Il modello di Ogden, come altri modelli per i materiali iperelastici, presume che il comportamento del materiale possa essere descritto mediante una funzione di densità dell'energia di deformazione, da cui si può derivare le relazioni sforzo-deformazione. Inoltre, il modello di Ogden si presenta sempre su base invariante ed è uno tra i modelli più popolari nell'ambito dei materiali iperelastici poiché descrive bene in comportamento dei materiali con deformazioni che arrivano sino al 700%.

In tale modello, la funzione di densità dell'energia di deformazione è data da:

$$W = \sum_{p=1}^N \frac{\mu_p}{\alpha_p} (\lambda_1^{\alpha_p} + \lambda_2^{\alpha_p} + \lambda_3^{\alpha_p} - 3) \quad 46.$$

Dove N è il numero di termini nella funzione e α_p e μ_p sono costanti del materiale. Per particolari valori delle costanti dei materiali, il modello di Ogden si riconduce al modello Neo-Hookean oppure al Modello Mooney-Rivlin. Infatti, per $N = 1, \alpha = 2$ si ottiene il modello Neo-Hookean mentre per $N = 2, \alpha_1 = 2, \alpha_2 = -2$ si ottiene il modello Mooney-Rivlin.

Si riporta per completezza l'approccio del modello matematico di Holzapfel-Gasser-Ogden analizzando dunque le caratteristiche di iperelasticità e anisotropia di un tessuto biologico, usando un approccio strutturale basato sulla teoria degli invarianti implementato attraverso modello costitutivo di Holzapfel-Gasser-Ogden. In qualunque posizione X del tessuto preso in considerazione, si ipotizza l'esistenza di un funzionale di energia elastica alla Helmholtz nella forma:

$$\Psi = U(X;J) + \bar{\Psi}(X; \bar{C}, A1, A2) \quad 47.$$

dove Ψ è l'energia libera del sistema, U è il contributo delle dilatazioni volumetriche e $\bar{\Psi}$ è il contributo isovolumetrico. In particolare, $\bar{\mathbf{C}} = \bar{\mathbf{F}}\bar{\mathbf{T}}\bar{\mathbf{F}}$ rappresenta il tensore destro di Cauchy-Green modificato e $\bar{\mathbf{F}} = \sqrt{J} \mathbf{F}$ è la parte unimodulare del gradiente delle deformazioni \mathbf{F} , con $J = \det(\mathbf{F}) > 0$.

Nell'equazione sono inoltre presenti i termini $A1$ e $A2$ i quali rappresentano due tensori del secondo ordine che caratterizzano l'anisotropia del tessuto per ogni punto X . Nello specifico, $A1$ e $A2$ sono definiti dal prodotto tensoriale tra $a01$ e $a02$, ovvero i vettori unitari che caratterizzano l'orientazione di ciascuna famiglia di fibre di collagene nella configurazione indeformata del tessuto. Sotto l'ipotesi di incompressibilità dei tessuti molli, il contributo di U è trascurabile. Ponendo invece l'attenzione sulle deformazioni isovolumetriche del potenziale, è possibile dividere l'equazione nel contributo isotropo, dato dalla matrice extracellulare, e quello anisotropo dato dalle fibre di collagene:

$$\bar{\Psi} = \bar{\Psi}_{iso}(X; \bar{I}1) + \bar{\Psi}_{aniso}(X; \bar{I}4, \bar{I}6) \quad 48.$$

Nell'equazione $\bar{I}1$ è il primo invariante della parte isovolumetrica del tensore C , mentre $\bar{I}4$ e $\bar{I}6$ sono il quarto e il sesto pseudo-invariante del tensore destro di Cauchy, ottenuti dalle formule:

$$\bar{I}4(C, a01) = C:A1, \bar{I}6(C, a02) = C:A2 \quad 49.$$

$\bar{I}4$ e $\bar{I}6$ definiscono il quadrato delle deformazioni delle due famiglie di fibre lungo $A1$ e $A2$. L'isotropia è dunque data dal primo invariante $\bar{I}1$, mentre l'anisotropia dagli invarianti $\bar{I}4$ e $\bar{I}6$. Poiché le fibre di collagene non sono coinvolte quando il tessuto è sottoposto a basse tensioni, si associa il contributo isotropo $\bar{\Psi}_{iso}$ alla risposta meccanica della matrice extracellulare del materiale. In particolare, la risposta della matrice è rappresentata attraverso il modello isotropo di NeoHookean, scritto nella forma:

$$\bar{\Psi}_{iso} = c/2 (\bar{I}1 - 3) \quad 50.$$

dove il parametro $c > 0$ [Pa] è il modulo di taglio del materiale, ed è dunque il fattore che descrive il contributo della matrice extracellulare in termini di resistenza. Aumentando il carico sul materiale, le famiglie di collagene cominciano ad allungarsi, aumentando la rigidità del materiale lungo la direzione delle fibre. L'energia elastica immagazzinata da ciascuna famiglia di fibre di collagene è esprimibile attraverso una funzione esponenziale:

$$\bar{\Psi}_{aniso} = k1/2k2 \{ \exp[k2/2 (\bar{I}4 - 1)^2] - 1 \} + k3/2k4 \{ \exp[k4/2 (\bar{I}6 - 1)^2] - 1 \} \quad 51.$$

Nell'equazione, i parametri $k1 > 0$ e $k3 > 0$ [Pa] sono i fattori che scalano il contributo delle fibre di collagene, descrivendole dunque in termini di resistenza. $k2 > 0$ e $k4 > 0$ sono i cosiddetti parametri

adimensionali di “uncrining” che regolano il livello di non linearità del modello. Per quanto detto attraverso le equazioni descritte le fibre di collagene non influenzano la risposta meccanica del tessuto per basse tensioni applicate. Poiché è lecito assumere l’ipotesi che le due famiglie di fibre abbiano le medesime caratteristiche fisiche e materiali ma differiscano unicamente per la loro orientazione, è possibile imporre $k_1 = k_3$ e $k_2 = k_4$.

L’equazione è dunque riscrivibile come:

$$\bar{\Psi} = c_2 (\bar{I} - 3) + k_1 k_2 \sum_{i=4,6} \{ \exp [k_2 (\bar{I}^i - 1)^2] - 1 \} \quad 52.$$

Si è dunque giunti alla formulazione di un modello iperelastico, anisotropo fibrorinforzato a due famiglie di fibre di collagene, suddiviso nel contributo isotropo della matrice extracellulare e i due contributi trasversalmente isotropi delle fibre. Un’ulteriore ipotesi assunta è quella di considerare le pareti dei tessuti come cilindri composti da un unico strato complessivo, trascurando dunque i singoli contributi degli strati di intima, media e avventizia. Lo strato è però costituito da un materiale composito fibrorinforzato da due famiglie di fibre di collagene disposte simmetricamente rispetto all’asse tangenziale del vaso. Il tessuto è dunque considerato come cilindricamente ortotropo. Imponendo un sistema di riferimento a coordinate cilindriche, le direzioni delle fibre sono date dai vettori riportati nelle equazioni seguenti:

$$[a_{01}] = [0 \cos(\gamma) \sin(\gamma)], [a_{02}] = [0 \cos(\gamma) -\sin(\gamma)] \quad 53.$$

dove γ è l’angolo compreso tra le fibre di collagene e la direzione tangenziale θ del vaso. Configurazione indeformata di un’arteria schematizzata, modellata come un tubo cilindrico a pareti spesse, considerando un unico strato complessivo, a due famiglie di fibre di collagene orientate lungo a_{01} e a_{02} . Il funzionale anisotropo dell’energia elastica proposto da Holzapfel assume che le fibre di collagene siano perfettamente allineate. Una nuova formulazione è quindi stata introdotta da Holzapfel-Gasser-Ogden includendo nel modello una misura di dispersione dell’orientazione di quest’ultime, generalizzando dunque il modello di Holzapfel. Nello specifico è stato introdotto un parametro scalare e adimensionale k che rappresenta i diversi arrangiamenti delle fibre. Il modello assume cioè che le direzioni delle fibre di collagene all’interno di ciascuna famiglia possa essere dispersa (con simmetria rotazionale) rispetto alla direzione preferenziale media. Il parametro k ($0 \leq k \leq 1/3$) descrive proprio il livello di dispersione delle fibre. Se $\rho(\theta)$ è la funzione di densità di orientamento che ne caratterizza la distribuzione (essa rappresenta il numero normalizzato di fibre con un orientamento compreso nell’intervallo $[\theta, \theta + d\theta]$ rispetto alla direzione media), il parametro k è definito secondo l’equazione:

$$k = \frac{1}{4} \int_0^\pi \rho(\theta) \sin^3 \theta d\theta \quad 54.$$

Si assume infine che tutte le famiglie di fibre abbiano, oltre che le stesse proprietà meccaniche, anche il medesimo grado di dispersione. Quando $k = 0$, le fibre sono perfettamente allineate, dunque senza dispersioni, e si ritorna al modello precedente di Holzapfel. Quando $k = 1/3$, le fibre sono distribuite casualmente e il materiale diventa isotropo; ciò corrisponde ad una funzione di densità di orientamento sferica.

Il contributo anisotropo di ciascuna famiglia di fibre è dunque riscritto secondo il modello di Holzapfel et al. (2007) nella forma:

$$\bar{\Psi}_{aniso} = k_1 k_2 [\exp\{k_2 [k\bar{I}_1 + (1 - 3k)\bar{I}_i - 1]^2\} - 1] \quad 55.$$

$$\text{con } i = 4, 6 \text{ e } k \in [0, 1/3].$$

L'equazione definitiva è dunque:

$$\bar{\Psi} = c_2 (\bar{I}_1 - 3) + k_1 k_2 \sum \{ \exp\{k_2 [k\bar{I}_1 + (1 - 3k)\bar{I}_i - 1]^2\} - 1 \} \quad 56.$$

$$\text{con } i=4,6$$

Per completezza, si riporta l'equazione di Holzapfel-Gasser-Ogden nella formulazione implementata dal software Abaqus:

$$U = C_{10}(\bar{I}_1 - 3) + 1/2 D ((J_{el})^{2-1/2} - \ln J_{el}) + k_1 k_2 \sum \{ \exp[k_2 (\bar{E}^a)^2] - 1 \} N_a = 1 \quad 57.$$

$$\text{con } \bar{E}^a \stackrel{\text{def}}{=} k(\bar{I}_1 - 3) + (1 - 3k)(\bar{I}_4(aa) - 1)$$

U è l'energia di deformazione per unità di volume, C_{10} , D , k_1 , k_2 e k sono i parametri del materiale già descritti, N è il numero di famiglie di fibre, \bar{I}_1 è il primo invariante delle deformazioni deviatoriche, $\bar{I}_4(aa)$ sono gli pseudo-invarianti di C e Aa , e J_{el} è il rapporto volumetrico elastico definito come:

$$J_{el} = 1 + \sum_{i=1}^3 \varepsilon_i \quad 58.$$

$$\text{con } J_{th} \stackrel{\text{def}}{=} (1 + \varepsilon_1)(1 + \varepsilon_2)(1 + \varepsilon_3)$$

dove ε_i sono le deformazioni di espansione termica principali ottenute dalla temperatura e dai coefficienti di espansione termica. \bar{E}^a è la quantità che caratterizza la deformazione delle famiglie di fibre con direzione media Aa .

3.2 MODELLAZIONE 3D DELL'ASSIEME E STRATEGIE DI OTTIMIZZAZIONE PER L'ANALISI FEM

La modellazione agli elementi finiti rappresenta uno dei metodi per poter simulare e predire il comportamento di un corpo sottoposto a forze esterne o forze interne.

In particolare il processo di modellazione passa attraverso più fasi che richiedono una conoscenza approfondita del fenomeno che si intende simulare e delle strategie di semplificazione che possono essere adottate senza introdurre nei risultati degli errori rilevanti. Nel nostro caso la modellazione di uno sferoide tumorale non è certamente univoca, specialmente legato al fatto che secondo lo stadio di crescita dello sferoide variano notevolmente le strutture interne in termini di densità e caratteristiche meccaniche. Infatti prima di configurarsi nella classica forma sferoidale passano durante l'oncogenesi attraverso stadi disomogenei e con sfericità che varia da 0.1 a 0.89. La simulazione è stata impostata utilizzando i dati estratti dalle analisi a microscopio a forza atomica, cioè con sferoidi maturati per 96 ore, nei quali è già ben delineata la suddivisione tra nucleo ed anello esterno.

Come primo passo si è resa necessaria una modellazione 3D dell'assieme ed una chiara distinzione delle parti di cui si intende simulare il comportamento e di cui si conoscono le proprietà meccaniche per procedere poi all'attribuzione delle corrette proprietà e definirne il modello di comportamento, regime elastico, plastico, iperelastico. Il processo è schematizzato nella figura 52, in particolare in tempi ridotti è possibile valutare la qualità della calibrazione analizzando il valore di deviazione al termine del processo selezionando uno ad uno i modelli matematici disponibili nel database: Mooney Rivlin, Ogden, Maxwell, Polinomiale, Prony etc etc, alcuni dei quali non sono oggetto di approfondimento in questo lavoro di tesi. In Figura 53 è rappresentato il modello 3D con le parti che lo compongono. Per l'attribuzione delle proprietà dei componenti si è ricorso al database disponibile sulla 3DExperience (Dassault Systems) e una applicazione dedicata che permette di calibrare il comportamento del materiale usando le prove sperimentali descritte nei capitoli precedenti. Nell'applicazione "Material Calibrations" è possibile quindi inserire le prove direttamente da un file .xls nella forma sforzo deformazione ed eventualmente identificare il tempo di esecuzione della prova o delle diverse prove sullo stesso materiale.

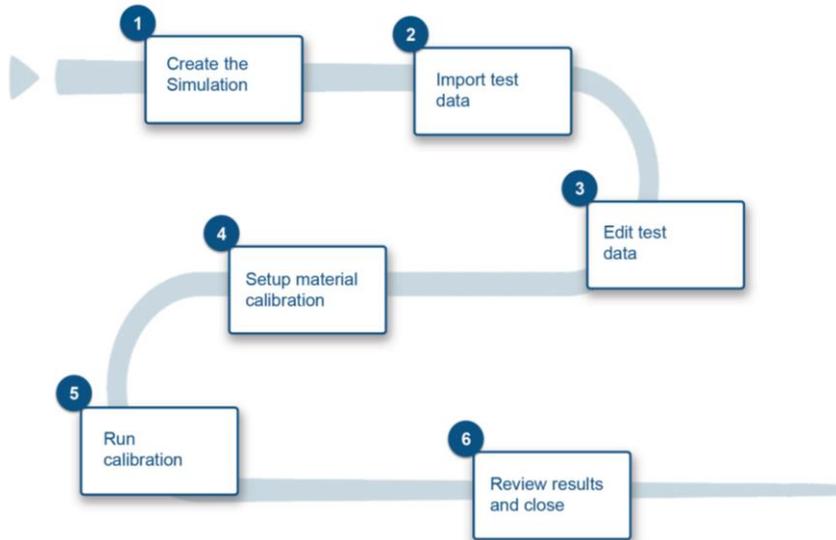


Figura 52: Diagramma a blocchi del processo seguito per la calibrazione dei materiali che prendono parte alla simulazione agli elementi finiti.

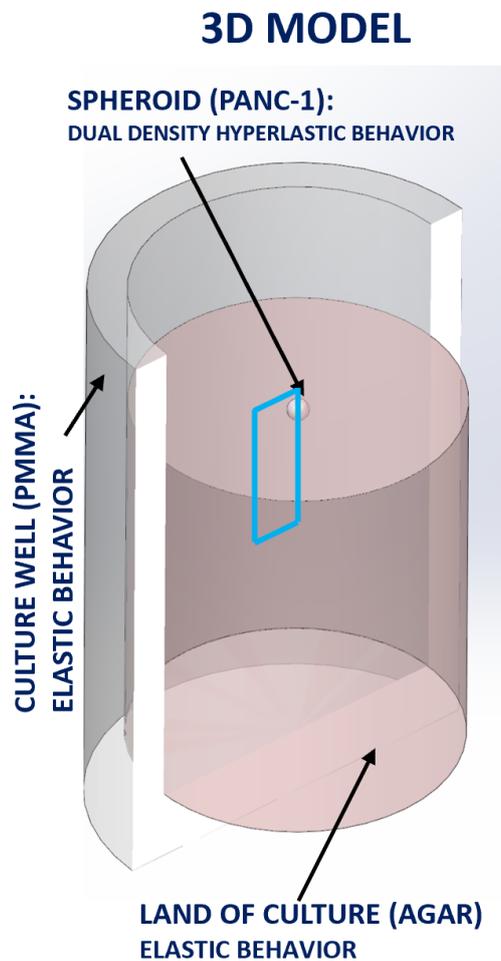


Figura 53: Assieme 3D per la modellazione agli elementi finiti

Al termine del processo di calibrazione appena descritto, lo sferoide Panc-1, in base alle prove effettuate con il microscopio a forza atomica, risulta ben allineato con il modello iperelastico di Ogden di 3° ordine e perfezionabile con un comportamento viscoelastico in serie di Prony di 3° come mostrato in figura 54.

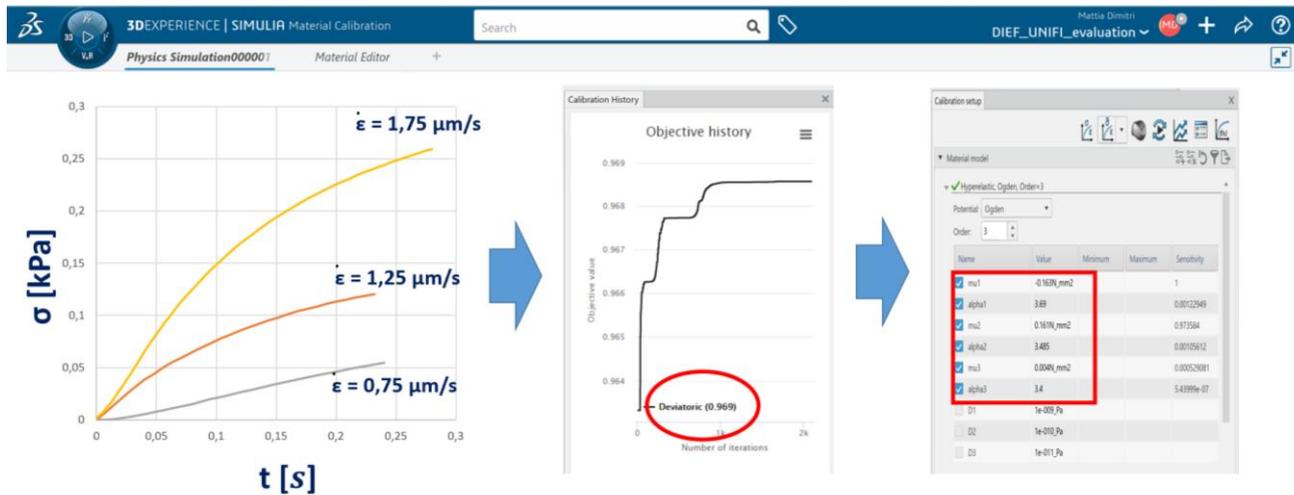


Figura 54: Estratto dall'applicazione per la calibrazione del materiale, da sinistra verso destra: curve caricate nel programma relative ai test effettuati,; analisi di deviazione del modello scelto; valori del modello di Ogden da importare nel solutore agli elementi finiti.

I restanti componenti sono stati definiti come comportamento elastico lineare.

Il protocollo di stimolazione prevede che ogni sferoide venga stimolato individualmente e per un tempo compreso tra 5 minuti e 20 minuti come descritto in letteratura dove si riportano degli effetti di mortalità indotti in altre tipologie di cellule cancerose in vitro e già presentati nel primo capitolo.

Il terreno di cultura è composto in prevalenza da Agarosio con una concentrazione del 1.5% per permettere allo sferoide di crescere e di cui sono note le caratteristiche meccaniche in termini di densità e modulo elastico anche grazie alla sperimentazione condotta nel capitolo precedente. In generale va osservato che la posizione dello sferoide rispetto al terreno di cultura non è sempre la stessa e soprattutto non è certo che si trovi esattamente sull'asse di simmetria del pozzetto ma che per una questione di semplificazione nel modello viene posizionato appena sotto la superficie dell'agarosio e sull'asse di simmetria del modello 3D.

Il MultiWells di cultura cellulare è realizzato in stampaggio in PMMA con caratteristiche di rigidità ben più elevata rispetto al materiale in analisi, motivo per cui può essere considerato indeformabile e schematizzato per ridurre il numero di elementi che discretizzeranno il modello.

3.3 DEFINIZIONE DELLA MESH E DEI VINCOLI

Nella modellazione agli elementi finiti è essenziale ottimizzare la scelta degli elementi da discretizzare, ossia “meshare” in quanto più elementi prendono parte alla simulazione e maggiori sono i tempi di calcolo con il rischio che singolarità matematiche sui vincoli o sui gruppi di contatto non portino a convergenza l’analisi.

Un altro aspetto chiave per riuscire ad individuare il corretto dimensionamento dell’elemento mesh che costituirà il componente consiste nello stabilire con quale rapidità avvenga un determinato fenomeno ed in questo caso trattandosi di uno studio dinamico di un’onda meccanica che attraversa un mezzo conoscerne le caratteristiche.

In questo caso si parla di onde acustiche che attraversano il mezzo ad una velocità di circa 1560 m/s il che ci definisce la corretta lunghezza d’onda alle diverse frequenze: ad 1 Mhz avremo una lunghezza d’onda di 1.5mm, a 2 MHz di 0.75mm ed a 3 MHz di 0.5mm. Per quanto riguarda la densità della mesh è essenziale che vi siano all’interno della lunghezza d’onda sufficienti nodi per descrivere correttamente gli effetti generati nel materiale al suo passaggio ecco perché è stata selezionata una mesh di almeno 2 ordini di grandezza inferiori alla lunghezza d’onda minore tra quelle utilizzate ossia per il nucleo la mesh size è di 5 micron mentre per l’anello esterno è di 8 micron, per l’agarosio è stata scelta una mesh globale da 10 micron.

Dopo numerosi tentativi di meshatura degli elementi in modalità tridimensionale si è reso evidente che il numero di nodi, a prescindere dal tipo di elemento (tetra o hexa), raggiungevano quantità prossime ai 100Mln di elementi con tempi di risoluzione dell’analisi di 10 giorni con il calcolatore a disposizione. È stata quindi adottata una strategia di semplificazione 2D tenendo conto dell’assialsimmetria del modello ed è stata ridotto anche il volume di analisi.

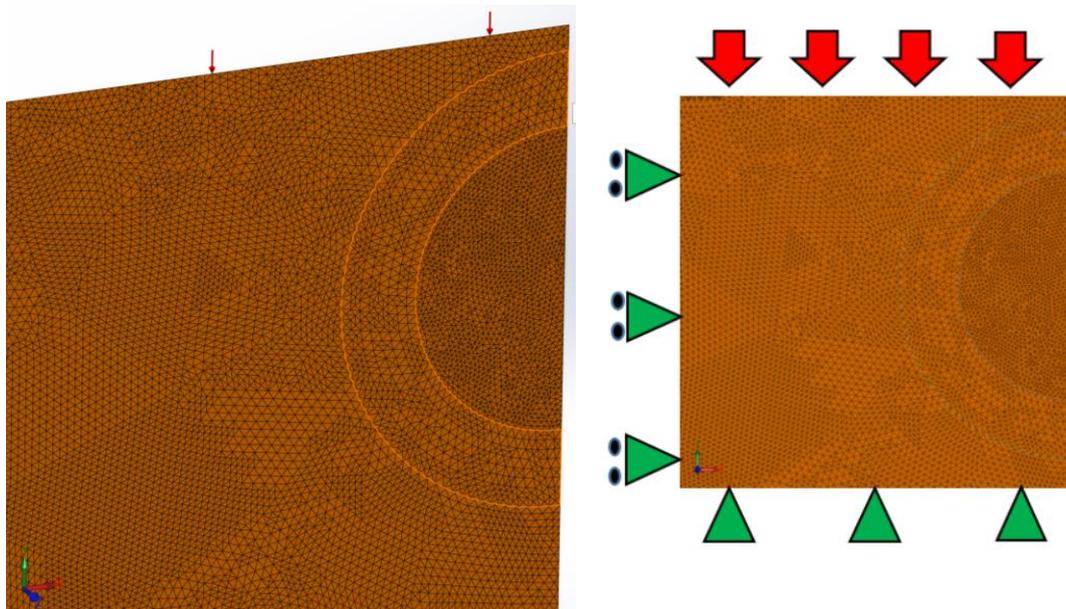


Figura 55: Discretizzazione del modello in mesh tetragonali e schematizzazione di carichi e vincoli

La semplificazione in assialsimmetria ha permesso di raggiungere un numero di elementi adeguato (circa 1.5 Mln) portando la risoluzione dell'analisi in tempi prossimi a 10 ore.

I vincoli scelti per la semplificazione dei contatti con il pozzetto di cultura in PMMA sono dei vincoli fissi sulla base del volume considerato per minimizzare il costo computazionale e dei vincoli di tipo carrello posti sulla parete laterale lasciando libero lo scorrimento lungo l'asse di propagazione delle onde meccaniche, evitando così l'insorgenza di hot spot di accumulo di tensione sulla circonferenza esterna del terreno di cultura a contatto con la parete del pozzetto.

3.4 DEFINIZIONE DEI CARICHI

Dopo una prima analisi sulla stabilità del sistema e la corretta definizione dei vincoli mediante l'applicazione di un carico statico, è stato predisposto un carico dinamico al sistema composto da una sinusoide con lunghezza d'onda specifica della frequenza prese in esame ed ampiezza fissata a 100 N/m², in figura 56 è riportato l'andamento dei carichi nel tempo applicati sulla superficie dell'agarosio questo tipo di andamento si pone l'obiettivo di riprodurre una sollecitazione generata da un trattamento LICU nel materiale bersaglio.

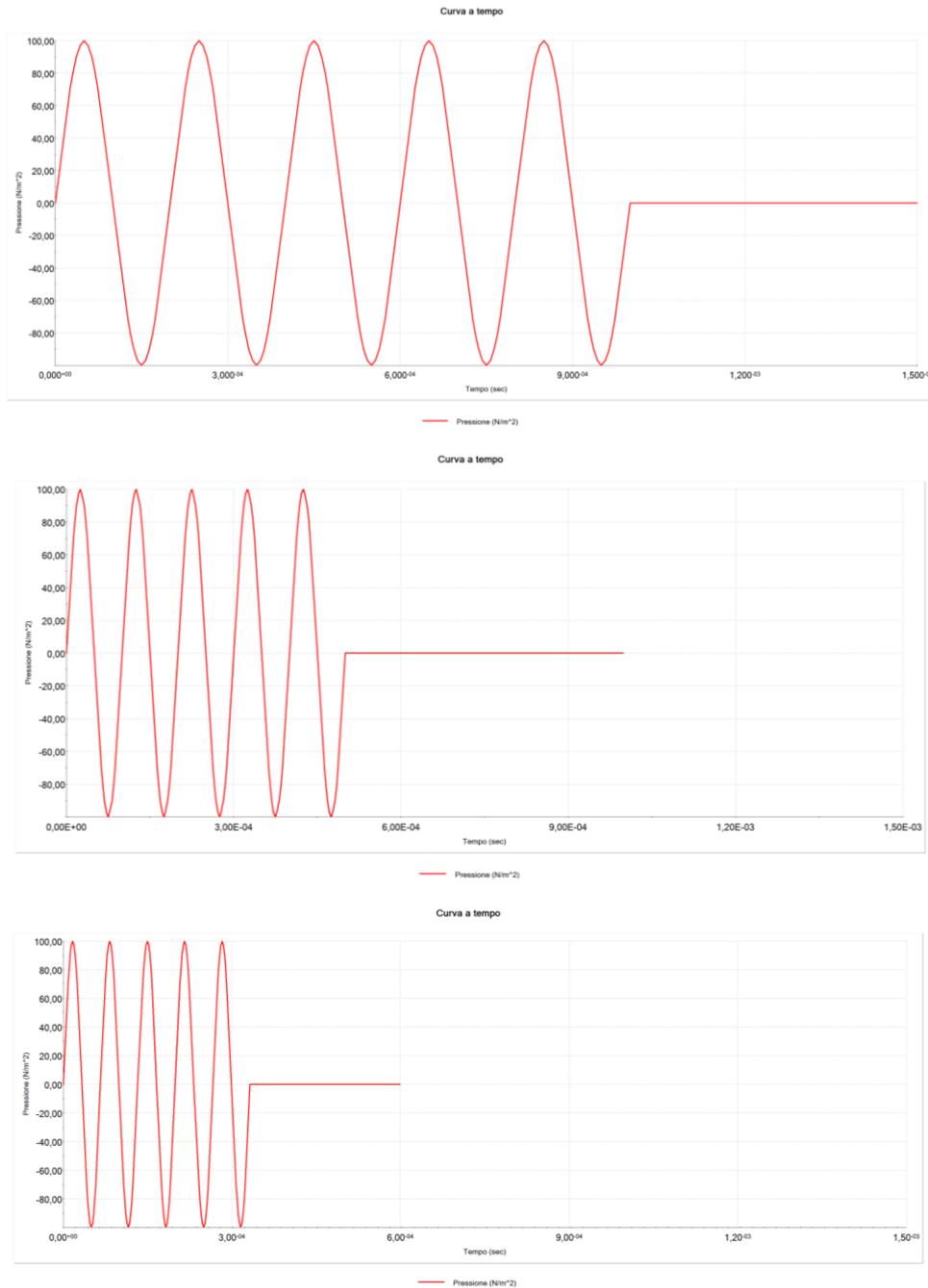


Figura 56: Carico di pressione Dinamico armonico alla frequenza di 1MHz (a), 2MHz (b), 3MHz (c)

Il massimo numero di iterazioni per simulazione è stato fissato a 1500 passi di soluzione per totale di 55Gb di dati da processare e immagazzinare per le successive valutazioni dei risultati con tempi di calcolo di circa 10 ore. Affinché si possano apprezzare gli effetti dell'onda che attraversa il materiale è necessario quindi impostare uno step di iterazione temporale di almeno 1 ordine di grandezza inferiore, il che ci porta ad un time step di $2e10^{-6}$ secondi per 1 MHz per arrivare sino a $1e10^{-7}$ per 5 Mhz.

3.5 ANALISI DEI RISULTATI E DEFINIZIONE DEI POSSIBILI EFFETTI BIOMECCANICI

La simulazione svolta sulla 3D Experience sfrutta il solutore di Abaqus che, dopo gli opportuni aggiustamenti, ha permesso di estrapolare dei valori di accumulo di stress all'interno dello sferoide alle diverse frequenze di indagine. Nella figura 57 è rappresentato in modo amplificato un'istante temporale della sollecitazione in vista bidimensionale con deformazioni amplificate 100 volte (figura 57a) ed in vista tridimensionale in scala reale (figura 57b): è evidente che le diverse proprietà meccaniche ed i modelli di comportamento associati alle varie parti dell'assieme comportino una disomogeneità nell'accumulo di tensione nei vari step temporali, è però ancora più di interesse andare a valutare quantitativamente l'andamento delle tensioni nei nodi maggiormente sollecitati all'interno del nucleo dello sferoide per prevedere quale potrà essere la risposta ad uno stato sollecitativo continuo con una lunghezza d'onda costante (1,2,3 o 5 MHz).

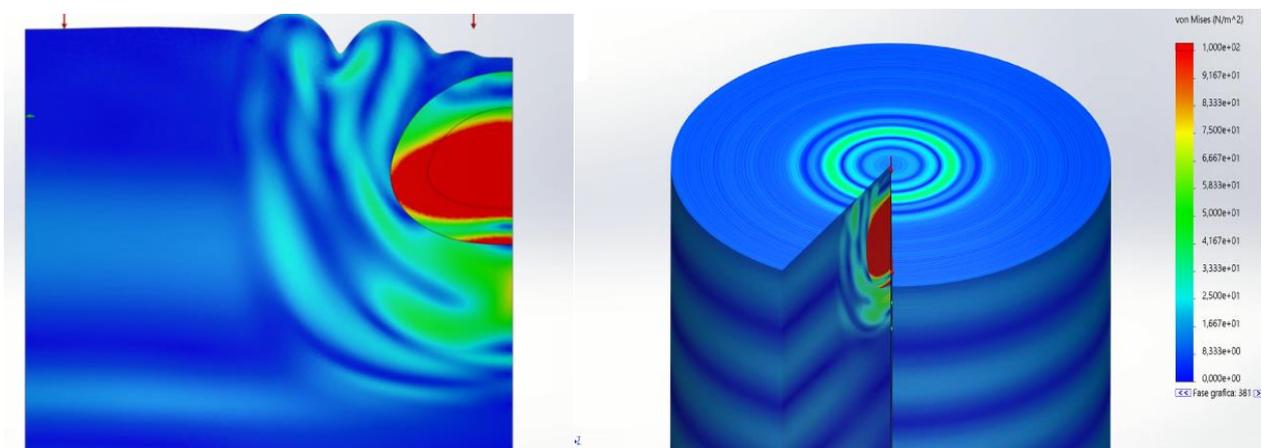


Figura 57: a) Visualizzazione 2D con scala di deformazione amplificata 100 volte sul piano di simmetria circolare delle sollecitazioni generate dal carico dinamico ; b) ricostruzione 3D dello stato di sollecitazione per assialsimmetria

Sono state quindi condotte le analisi alle diverse frequenze, la figura 58(a) mostra i time step in cui sono stati raggiunti i massimi valori di sollecitazione nodale all'interno del nucleo, il valore massimo di scala è fissato a 100N/m^2 .

Per i nodi con il massimo valore di sollecitazione è stato estratto il grafico corrispondente all'andamento temporale che è riportato nella figura 58 (b).

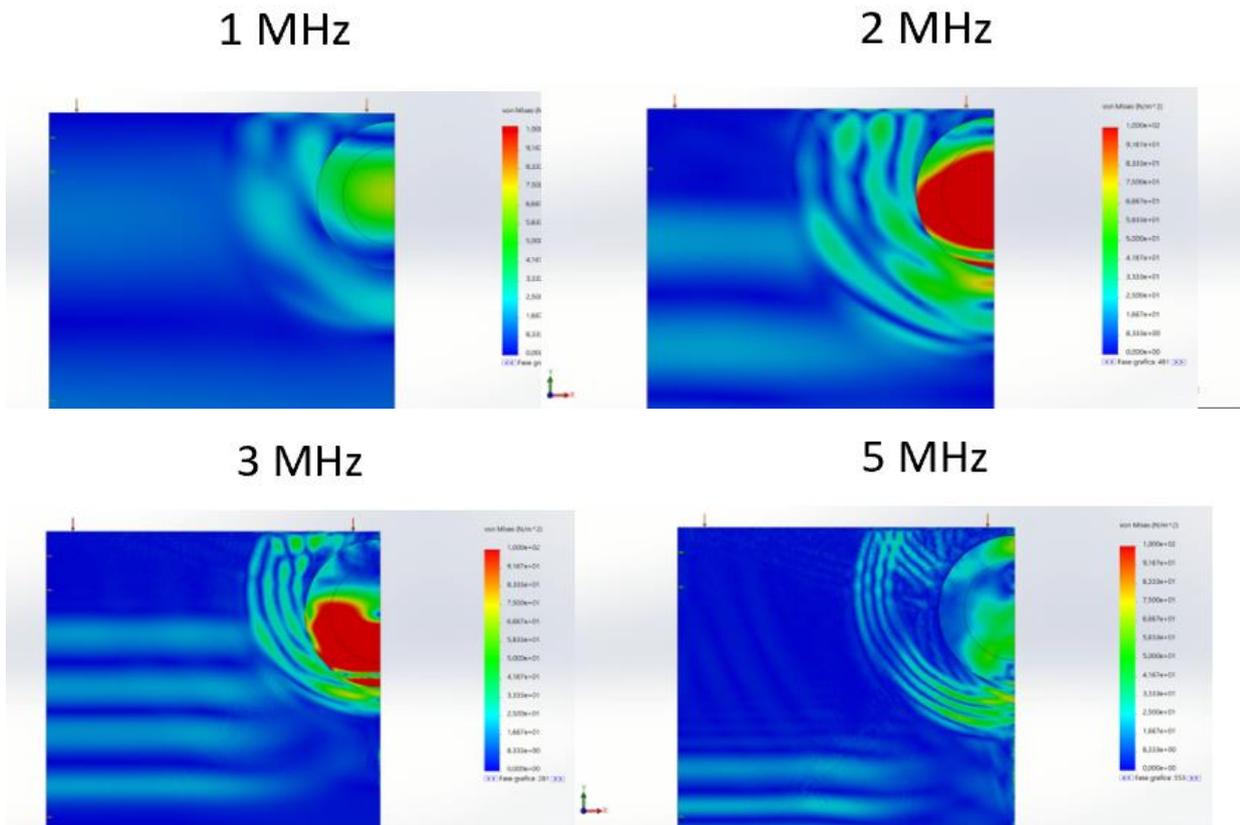


Figura 58a: Stato di sollecitazione interno al nucleo dello sferoide alle diverse frequenze di applicazione del carico di pressione dinamico

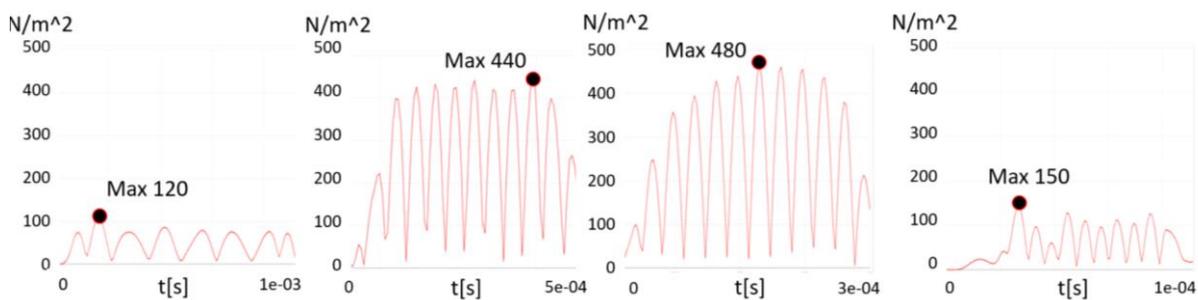


Figura 58b: Mappatura nel tempo della sollecitazione accumulata nel nucleo dello sferoide alle diverse frequenze, partendo da sinistra, in ordine, 1,2,3,5 MHz.

Come era atteso, le risposte dei nodi sono profondamente diverse al variare della frequenza, in particolare si evidenzia come alle frequenze di 2 e 3 MHz le sollecitazioni interne raggiungendo valori fino a 4 volte superiori rispetto alle frequenze esterne di 1 e 5 MHz. Questo comportamento, per quanto limitato ad un periodo di tempo molto ristretto rispetto all'intera durata della stimolazione ad US, e che si riferisca all'energia fornita da soli 5 periodi completi, può rappresentare comunque una linea guida da seguire per la messa a punto del protocollo di stimolazione sperimentale che sarà approfondita nel prossimo capitolo.

CAPITOLO 4

REALIZZAZIONE DI UN SETUP SPERIMENTALE PER LA STIMOLAZIONE LIUS *IN VITRO* DEGLI SFEROIDI

In questo capitolo verranno presentati i componenti che comporranno il setup per la stimolazione ad LIUS degli sferoidi tumorali e le parti di supporto progettate ad hoc e realizzate mediante produzione additiva. A fronte della caratterizzazione del fascio ad US e dei primi test termici viene definita quindi la strategia di posizionamento degli sferoidi nel MultiWells ed i parametri che saranno utilizzati per il trattamento LIUS con protocollo non pulsato (LICU).

4.1 CONCEPT DESIGN E MODELLAZIONE 3D DEL SETUP AD IMMERSIONE

Il nuovo setup per il trattamento ad LIUS ad immersione, rispetto al setup descritto nel primo capitolo, ha richiesto più tempo per la sua realizzazione, in particolare la fornitura di componenti prodotti ad hoc dai vari fornitori sulle specifiche richieste ha visto numerosi adeguamenti e modifiche in corso d'opera: nella figura 59 sono riportati i principali elementi costitutivi.

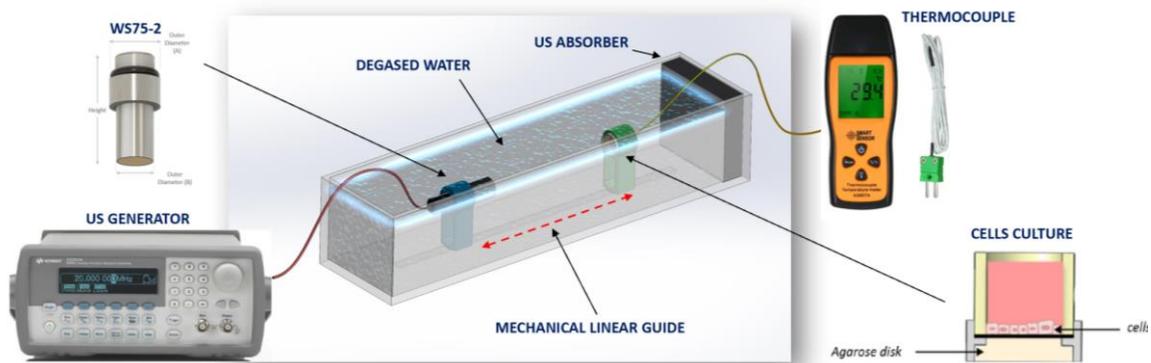


Figura 59: Schema dei componenti che comporranno il setup ad immersione per la stimolazione ad ultrasuoni

Il contenitore in cui sono collocati i vari componenti è stato realizzato con misure custom mediante un processo di taglio al laser di pannelli in plexiglass che poi sono stati successivamente uniti con resina bicomponente: l'utilizzo di pannelli trasparenti permette di migliorare la visuale all'interno del setup e di rilevare eventuali anomalie o posizioni relative non corrette sia durante la fase di settaggio del setup che durante la fase di stimolazione degli sferoidi.

L'acqua che viene utilizzata per questo tipo di sperimentazione è degasata per eliminare completamente l'attenuazione degli ultrasuoni dall'eventuale presenza di microbolle. La sonda ad ultrasuoni, individuata come idonea dopo un'approfondita analisi della letteratura confrontata con le analisi agli elementi finiti dettagliate nel precedente capitolo, è allocata in un supporto in ABS completamente realizzato in stampa 3D con tecnica Fused Deposition Modeling (FDM) per estrusione di materiale plastico fuso e deposizione sul piatto di stampa, capace di alloggiare sia la sonda che un sistema di puntamento laser appena sopra il pelo d'acqua; la cultura cellulare sarà alloggiata su un supporto progettato secondo le dimensioni del MultiWells utilizzato durante l'incubazione e dovrà assolvere al compito di isolare il campione dal contatto con l'acqua, rendendo quindi l'intero MultiWells "waterproof". I due supporti appena descritti saranno fissati su una guida lineare alloggiata sul fondo del contenitore in plexiglass: la guida permetterà, attraverso delle tacche

di misura, di modificare manualmente la posizione relativa campione/sonda tra una stimolazione e l'altra. Questa funzione è fondamentale per poter stimolare alle diverse distanze focali delle frequenze investigate ed in funzione dell'intensità di pressione che si vuole generare sullo sferoide in trattamento.

Posizionato sul fondo del pozzetto da stimolare viene collocata una termocoppia di spessore 50 micron che permette di leggere attraverso un multimetro la temperatura in tempo reale durante tutta la procedura di stimolazione. La generazione del segnale avviene attraverso un generatore di onde, che sarà trattato in dettaglio nel paragrafo dedicato all'accoppiamento con l'amplificatore RF custom. Infine dietro al MultiWells viene posto, ad una distanza di 100mm, un pannello di materiale fonoassorbente specifico per le frequenze utilizzate nella sperimentazione: questo dettaglio è fondamentale per non avere un'alterazione dei risultati dovuto alle onde acustiche di ritorno che si riflettono nella modalità descritta nel primo capitolo al cambio di interfaccia acqua-plexiglass e plexiglass-aria.

4.2 SCELTA DEL TRASDUTTORE AD US

A fronte delle indagini sperimentali condotte nel capitolo 1 è emerso chiaramente che spingersi su frequenze superiori ai 2.25Mhz con sonde non focalizzate porti a definire una scelta operativa: scegliendo di utilizzare intensità acustiche più elevate per raggiungere tumori profondi si corre il rischio di generare effetti ipertermici che possono portare a termoablazioni o danni collaterali al tessuto sano, il che impedirebbe di rendere transcutaneo il trattamento LICU, rendendo l'applicazione più invasiva per il paziente attraverso un intervento laparoscopico per portare la sonda più vicina possibile alla zona da trattare. A fronte di queste considerazioni e ritenendo che un trattamento transcutaneo rappresenti di certo una migliore soluzione, è stata fissata come frequenza massima di esercizio della sonda a 3MHz.

Vengono riassunti quindi nella tabella 10 gli studi che in letteratura evidenziano un'efficacia del trattamento antitumorale ad US a bassa intensità.

AUTHORS	CELLS TYPE	ACOUSTIC INTENSITY	FREQUENCIES [MHz]	PROBE DIAMETER	PROTOCOL
Mfoumou et al.	Human breast and cervical uther cancer	< 1 mW/cm ²	0.8	5 mm	Coninuuous / T = 6 h
Louw et al.	Bovine chondrocyte	360 – 1800 mW/cm ²	2; 5; 8	12.7 mm Focused	Pulsed / Immersed / T = 150, 60, 37.5 s / P = 14 kPa
Ivone et al.	Human myelomonocytic lymphoma U937	90 mW/cm ²	0.6 – 0.4	20 mm	Pulsed PRF = 10 Hz / T = 180 s
Hrazdira et al.	Human Cervical uther cancer	50, 100, 500 mW/cm ²	0.8 MHz	30 mm	Coninuuous / T = 300 - 1500 s
Furusawa et al.	Human leukemia	100 – 400 mW/cm ²	1 MHz	15 mm	Pulsed PRF =200 Hz / 61, 105, 132 and 144 kPa / T = 60s
Lejbkowitz Salzberg	Sane and damaging	330 mW/cm ²	0.020	50 mm	Coninuuous / T = 240 s
Wang et al.	Human leukemia	640; 1000; 2100 mW/cm ²	1.1 MHz	15 mm Focused	Coninuuous / T = 60 s
Hu et al.	Human Neuroblastoma	2400 mW/cm ²	1 MHz	25.4 mm	Pulsed PRF = 2 KHz / T = 600 s
Pounder e Harrison	Bone healing	30 mW/cm ²	1.5 MHz	20 mm	Pulsed PRF = 1 kHz / Immersed / T = 120s / P = 1500 kPa
Ivone et al.	Human breast	100 mW/cm ²	0.4 – 0.6	20 mm	Pulsed PRF = 200 Hz / Immersed / T = 120 s

Tabella 10: Classificazione degli studi disponibili in letteratura e dei rispettivi parametri utilizzati per la stimolazione con gli ultrasuoni a bassa intensità

In letteratura è stato individuato un solo studio che prende in esame il comportamento di un tumore composto da cellule di PANC-1 espantato da una cavia e successivamente sottoposto ad un trattamento LICU con frequenze nell'intorno di 1 MHz e potenze ben lontane dal poter produrre effetti termici ed effetti meccanici[57]. Per la scelta del range di frequenze da testare sono stati presi in considerazione anche studi di trattamenti ad US che mostrassero effetti rigenerativi di specifiche cellule sane: tal proposito è emerso che frequenze comprese tra 1 e 3 Mhz inducano processi di osteogenesi [58]. Alla luce di queste ulteriori considerazioni è stata selezionata una sonda con frequenza nominale a 2MHz, capace di mantenere buone caratteristiche di fascio da 0.5 MHz fino a 3 MHz. La sonda di tipo ad immersione è costituita da un materiale piezoelettrico al metaniobato di Piombo (PbNb₂O₆), è prodotta dalla The Ultrason Group Spa Group (modello WS75-2) ed è descritta nella figura 59 nelle sue componenti interne.

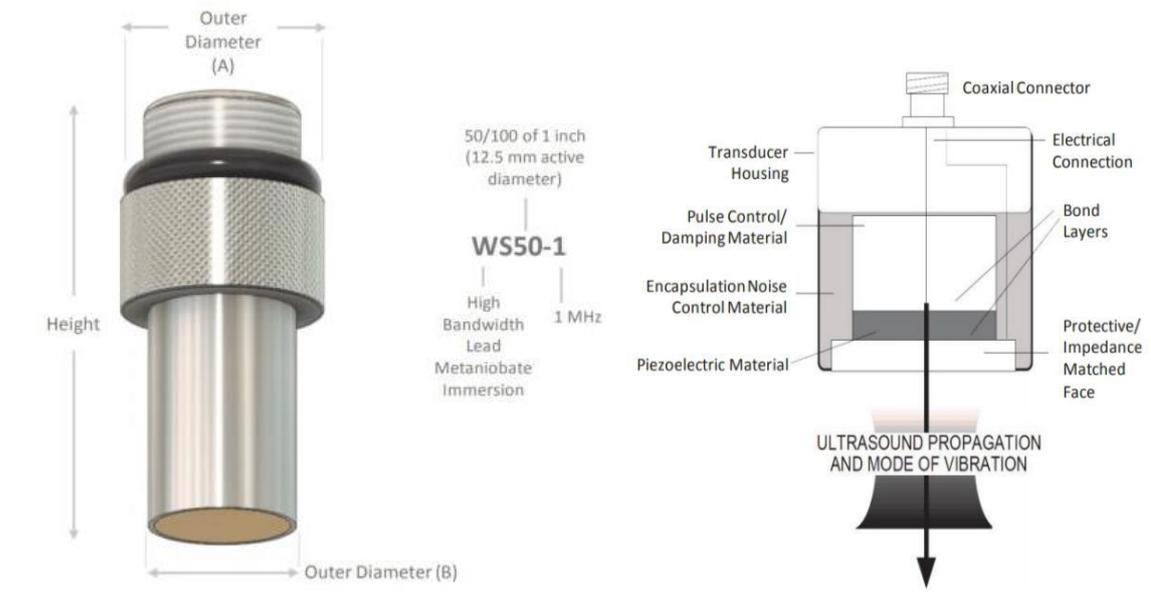


Figure 59: Sonda ad US della The Ultran Group Spa ad immersione e vari modelli. Il modello acquistato è il WS75-2, diametro attivo 19mm

4.2.1 CARATTERIZZAZIONE DEL FASCIO AD US E MAPPATURA DEL CAMPO DI PRESSIONE A 1,2,3 MHz

La mappatura del campo di pressione acustica generato dalla sonda è una procedura fondamentale per la definizione delle strategie di stimolazione ed il conseguente protocollo da adottare (Tempo esposizione – Distanza dalla sonda). In questo paragrafo si analizzeranno i parametri della sonda che sono stati utilizzati dal fornitore (The Ultran Group Spa Group) con sue relative mappe di pressione 3D. In generale qualsiasi segnale periodico può essere rappresentato come somma di sinusoidi a frequenze multiple (armoniche) della frequenza del segnale (frequenza fondamentale) tramite la rappresentazione di Fourier. Per i segnali aperiodici si considera il segnale periodico con periodo T tendente all'infinito ottenendo quindi una rappresentazione nel dominio della frequenza del segnale che potrà essere analizzato facilmente in termini di energia e potenza. In questo paragrafo è infatti valutato un segnale come un treno di impulsi che è stato usato dal fornitore della sonda ad US per caratteristiche il campo di pressione generato dal trasduttore. Nel caso di sinusoidi per valutare il segnale in termini di energia trasmessa bisogna prendere il valore efficace del segnale:

$$V_{eff} = \frac{V_p}{\sqrt{2}} \quad 59.$$

Nel caso di un segnale ad impulso si cerca un valore che sia equivalente al valore efficace nelle sinusoidi. Prendiamo il segnale utilizzato dalla The Ultran Group Spa, un impulso singolo con picco di 300 V che è idealmente una delta di Dirac ma che nella realtà è rappresentato da un'onda quadra:

$$v(t) = 300 \cdot \text{rect}\left(\frac{t}{\tau}\right)$$

60.

Consideriamo il periodo tendente all'infinito, quindi applichiamo la trasformata di Fourier:

$$TF\{v(t)\} = V(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} v(t)e^{-j2\pi ft} dt = \int_0^{\tau} 300 \cdot e^{-j2\pi ft} dt = \frac{-300}{j2\pi f} (e^{-j2\pi f\tau} - 1) = 300 \cdot \tau \cdot \text{sinc}\left(2\pi f \frac{\tau}{2}\right) \quad 61.$$

Lo spettro in frequenza dipenderà sia dalla frequenza sia dal Duty Cycle $\frac{\tau}{T}$, che idealmente è 0 essendo T tendente all'infinito, ma realmente essendo T molto grande ma non infinito, il Duty Cycle è molto piccolo: lo spettro in frequenza misurato dalla The Ultran Group Spa viene illustrato in figura 60.

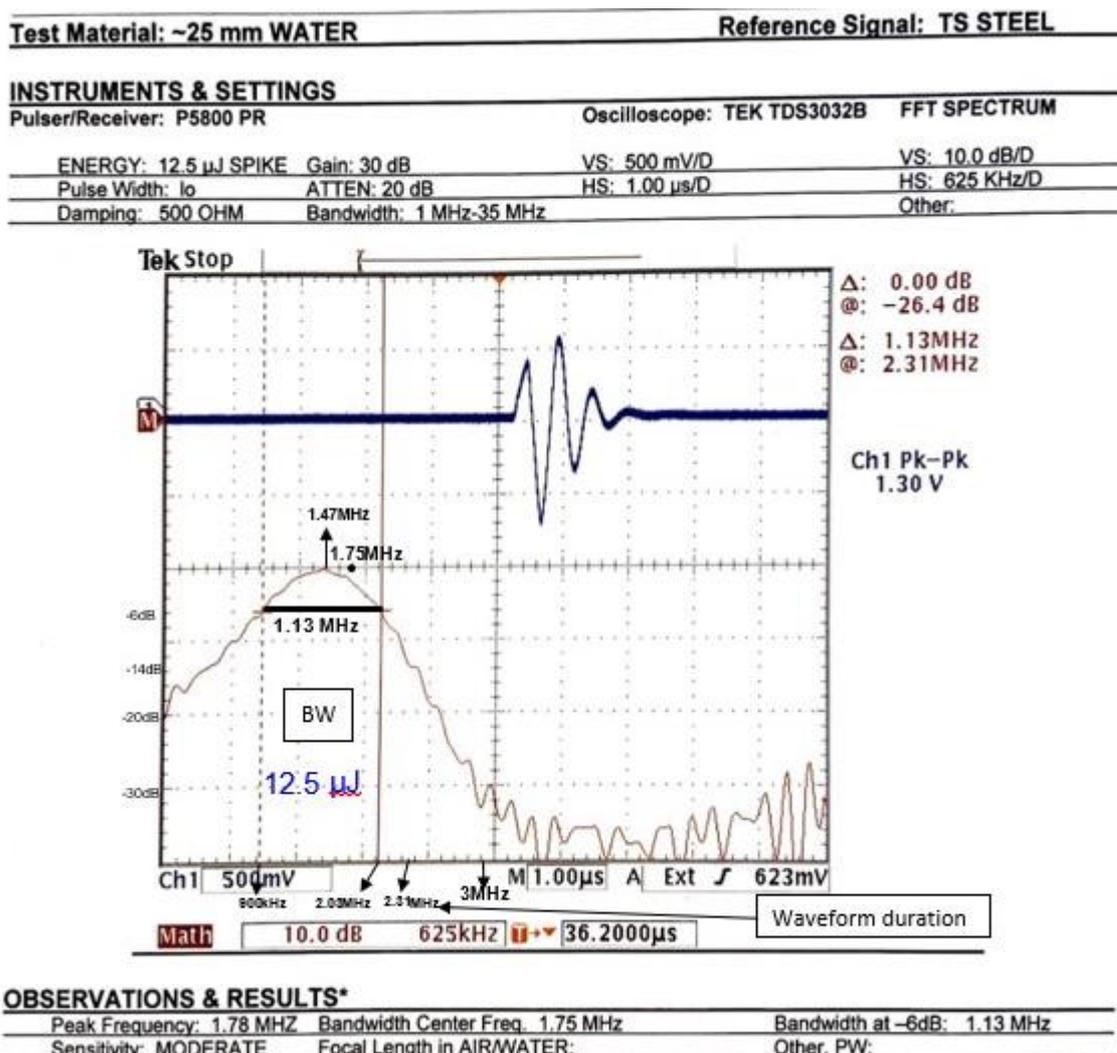


Figura 60: Impulso nel tempo e spettro della FFT dell'impulso sopra descritto ed i parametri di rilevanza

I test successivi effettuati dal fornitore sono stati eseguiti con un idrofono prodotto dalla Honda disponibile presso USCNDLab. nel seguente modo:

- Il trasduttore è stato pilotato con un treno di impulsi;
- Il treno di impulsi utilizza un'onda quadra a una frequenza fissa (1,2 e 3 MHz);
- L'ampiezza del segnale $v(t)$ è stata di +/- 195 V (390 V pk-pk) per guidare il trasduttore per questo particolare test;
- L'idrofono è stato configurato come ricevitore;
- Il profilo del fascio ultrasonico è stato realizzato con gradini di 0,5 mm su un'area di 274 mm x 37 mm;
- Le sezioni trasversali del fascio ultrasonico è stato realizzato con passo di 0,25 mm su un'area di 30 mm x 30 mm;

Si consideri ora un treno di impulsi rettangolari di periodo T_0 , con ampiezza ± 195 V e duty cycle $\frac{\tau}{T_0}$ del 50%. Dall'analisi di Fourier si può scomporre l'onda quadra in somma di armoniche a frequenze multiple della fondamentale:

$$v(t) = \frac{A_0}{2} + \sum_{k=1}^{\infty} A_k \cdot \sin\left(\frac{k\omega t}{T_0}\right) \quad 62.$$

Dove A_0 è il valore medio che è nullo per questo tipo di onda. Gli altri coefficienti sono dati da:

$$A_k = \frac{2}{T_0} \int_{-\frac{T_0}{2}}^{\frac{T_0}{2}} v(t) \cdot \sin(k\omega t) dt = \frac{2}{T_0} \left[\int_{-\frac{T_0}{2}}^0 -195 \cdot \sin(k\omega t) dt + \int_0^{\frac{T_0}{2}} 195 \cdot \sin(k\omega t) dt \right] \quad 63.$$

$$= \frac{2}{T_0} \left\{ \frac{-195}{k\omega} \left[-\left(\cos(0) - \cos\left(\frac{-k\omega T_0}{2}\right) \right) \right] + \frac{195}{k\omega} \left[-\left(\cos\left(\frac{k\omega T_0}{2}\right) - \cos(0) \right) \right] \right\} \quad 64.$$

$$= \frac{2 \cdot 195}{k\omega} \left(2 - 2 \cos\left(\frac{k\omega T_0}{2}\right) \right) = \frac{4 \cdot 195}{k\omega} \left(1 - \cos\left(\frac{k\omega T_0}{2}\right) \right) \quad 65.$$

Ricordando che $\omega = \frac{2\pi}{T}$ e sostituendo si ottiene

$$A_k = \frac{2 \cdot 195}{k\pi} (1 - \cos(k\pi)) \quad 66.$$

Se k è pari

$$A_k = 0 \quad 67.$$

Se k è dispari

$$A_k = \frac{780}{k\pi} \quad 68.$$

I coefficienti dello sviluppo di Fourier del segnale dipenderanno quindi dal duty cycle. Per $k=1$ e duty cycle del 50%, la prima componente sinusoidale chiamata fondamentale, alla frequenza f_0 del segnale sarà:

$$A_1 = \frac{780 V}{\pi} = 248,28 V$$

69.

Il valore trovato è il valore efficace del segnale utilizzato per il test con l'idrofono. In figura 61 viene rappresentato il concetto appena descritto.

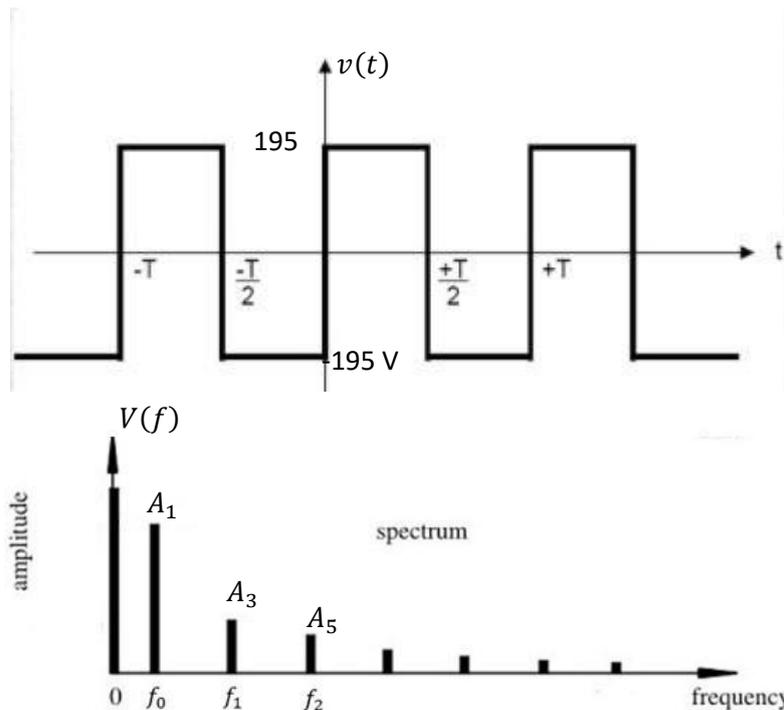


Figura 61: Rappresentazione del segnale ad onda quadra con ampiezza, frequenza f_0 e Duty Cycle del 50%. In alto la rappresentazione nel tempo. In basso lo spettro in frequenza

La descrizione del campo generato da un trasduttore comporta la misura delle variazioni temporali e spaziali della pressione acustica. Le misure vengono effettuate di solito in acqua per mezzo di un idrofono, e dai valori di pressione rilevati è possibile calcolare i valori di intensità acustica. Per le applicazioni biomediche vengono specificate una serie di parametri caratteristici che possono essere ricavati dalla forma d'onda rilevata dall'idrofono (supponendo che il trasduttore lavori in regime impulsivo). Se M è la sensibilità dell'idrofono e V è il segnale elettrico misurato ai suoi capi, la pressione acustica viene ricavata dalla seguente formula:

$$p = \frac{V}{M} Pa$$

70.

Altri due parametri importanti per la trattazione di segnali impulsivi sono:

- PRR [Hz]: Frequenza di ripetizione dell'impulso (numero di impulsi al secondo)
- PRP [s]: Periodo di ripetizione dell'impulso

Esse sono legate dalla relazione:

$$PRP = 1/PRR \quad 71.$$

Grazie ai dati che ci sono stati trasmessi dal fornitore è stato possibile effettuare un'analisi della pressione acustica esercitata dalla sonda US nello spazio e definire, in attesa di un test specifico con l'amplificatore di potenza a banda stretta sviluppato appositamente per il progetto di dottorato, le zone di massima pressione acustica in cui far corrispondere la posizione delle culture cellulari da trattare. Questo ha permesso quindi di scegliere i pozzetti in cui coltivare gli sferoidi, in modo da poter effettuare 4 stimolazioni su sferoidi differenti per ogni MultiWells: questo protocollo ha permesso di massimizzare il numero di sferoidi trattati per ogni sessione, riducendo al minimo la sovrapposizione degli effetti generati dai fasci di US. Nelle figure in seguito sono descritte in dettaglio le dimensioni della lunghezza focale F , larghezza del piano focale w e la profondità di campo. Data la simmetria del fascio sonoro sono stati approssimati i valori lungo l'asse Z a quelli lungo l'asse X. Per prime sono riportate le scansioni effettuate dalla The Ultran Group Spa nel piano XZ.

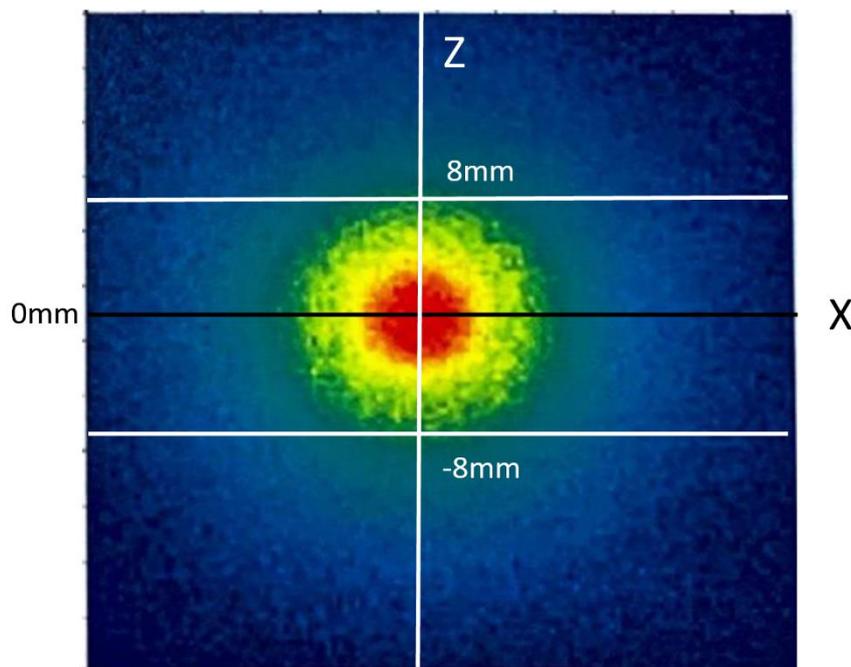


Figure 62: Sezione trasversale del fascio ad ultrasuoni nel piano XZ generata dal trasduttore quando la frequenza del segnale è di 1 MHz. La sezione considerata è quella del piano focale ossia dove si ha il massimo valore di pressione e la massima focalizzazione naturale del fascio.

In figura 63 è riportato l'andamento quantitativo riferito alla figura 62 della pressione picco-picco sul piano trasversale alla distanza del fuoco naturale dalla sonda.

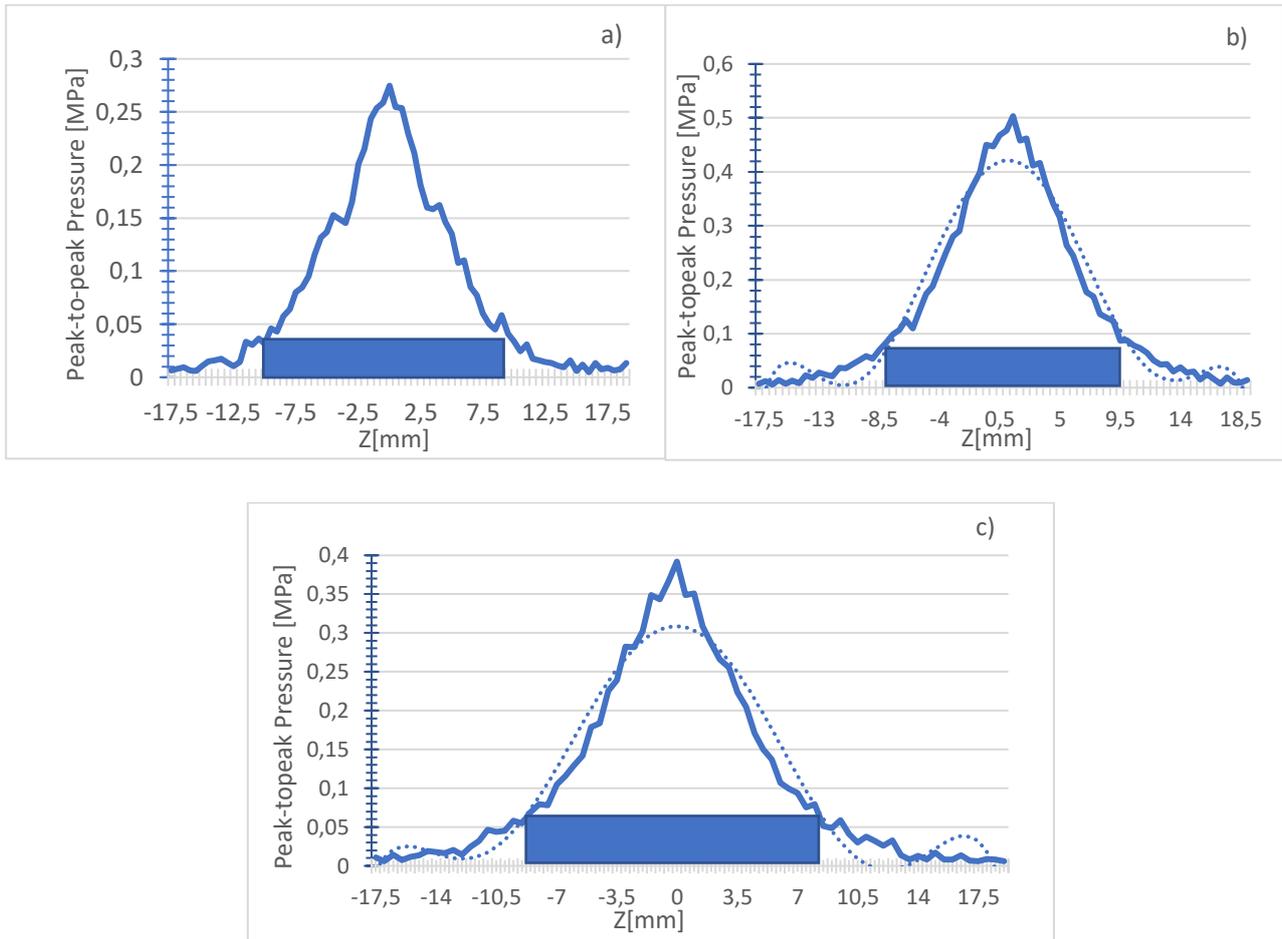


Figura 63: Mappatura della pressione acustica sul piano trasversale XZ alla distanza focale di ciascuna frequenza analizzata: a) 1 MHz; b) 2 MHz; c) 3 MHz. I rettangoli in blu rappresentano la zona in cui la pressione assume valori superiori a -6 dB (18 mm approssimativi).

In base alle considerazioni appena illustrate è stato possibile individuare la miglior disposizione degli sferoidi nei pozzetti di stimolazione. Sono riportate in seguito le mappature della pressione lungo l'asse orizzontale Y.

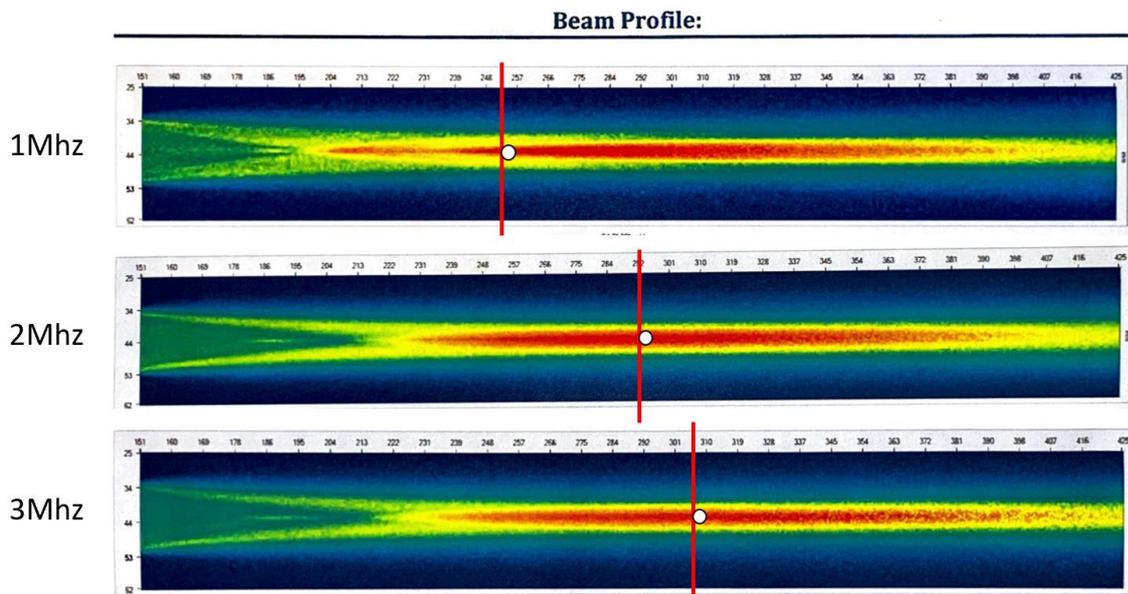


Figura 64: Campi di pressione 3D alle diverse frequenze di lavoro, realizzati dal produttore (The The Ultran Group Spa Group Spa) dalla sonda ad ultrasuoni.

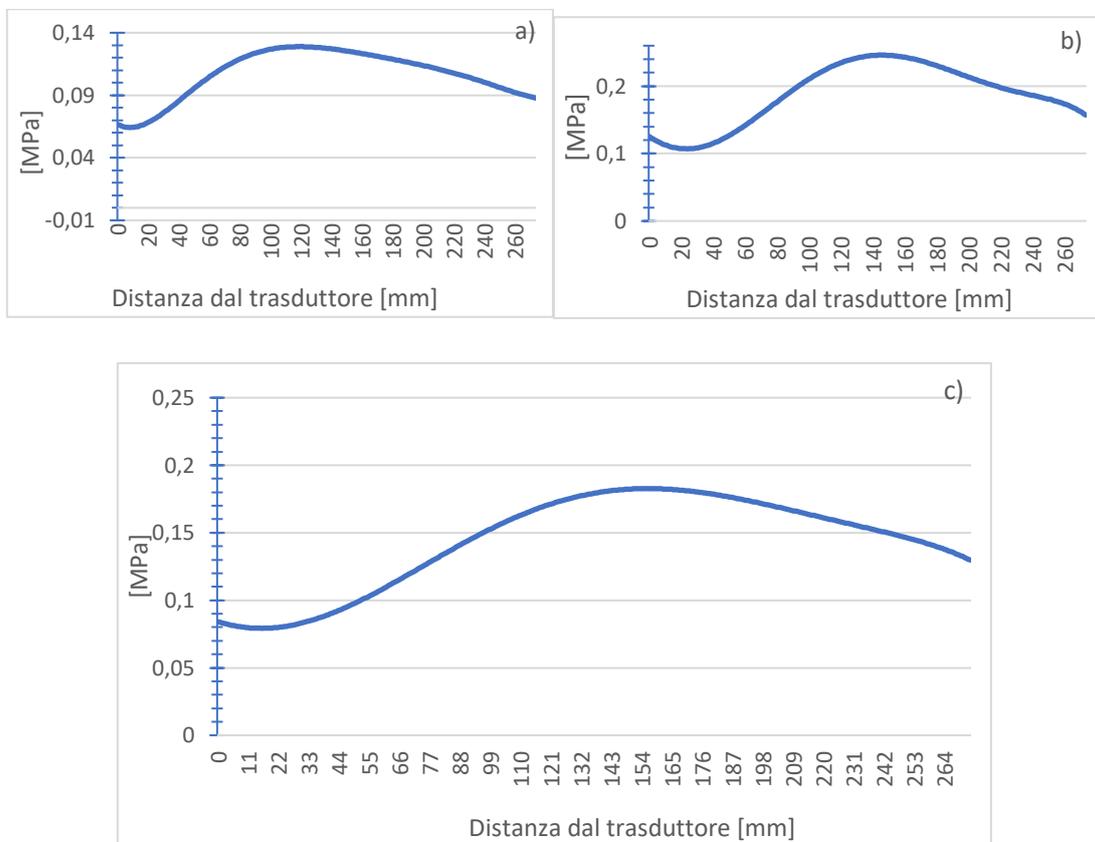


Figura 65: Mappature della pressione acustica lungo l'asse Y longitudinale di propagazione del fascio eseguita dalla The Ultran Group Spa: a) frequenza di 1 MHz; b) frequenza di 2 MHz; c) frequenza di 3 MHz.

In base ai grafici in figura 64 e 65, ricavati dalla caratterizzazione fornita dal produttore, è stato possibile predisporre le configurazioni da adottare per la sperimentazione e con la conoscenza delle proprietà geometriche del campo di pressione generato dalla sonda ad US utilizzata è stato possibile progettare i componenti del Set-up ad immersione che permettessero di un posizionamento alle reciproche distanze per la stimolazione alle varie frequenze indagate.

4.3 PROGETTAZIONE DEI SUPPORTI E STRATEGIE DI CALIBRAZIONE DEL SET-UP SPERIMENTALE PER LE DIVERSE FREQUENZE

La progettazione dei componenti è stata effettuata mediante di tecniche di rilievo laser scanner e tecniche di reverse engineering della sonda, del MultiWells standard mostrato in figura 66(a) utilizzato per le culture cellulari; successivamente i modelli parametrici ottenuti con SolidWorks sono stati analizzati dal punto di vista strutturale per mezzo di analisi agli elementi finiti si cui si trascura la trattazione in quanto si tratta di semplici dimensionamenti basati su carichi statici. Nella figura 66(c) sono chiaramente rappresentati tutti i componenti definitivi che saranno impiegati per la sperimentazione. In particolare la slitta inferiore sarà realizzata con processo tradizionale di asportazione di truciolo. Partendo da un profilato a sezione rettangolare in teflon viene fresato un canale centrale nel quale saranno poi ricavati una fila di fori calibrati M4 a distanza di 10mm l'uno dall'altro e successivamente filettati tramite un processo di maschiatura manuale. I fori in questione saranno poi usati per ancorare alla guida in teflon dei blocchetti in alluminio ricavati per mezzo di taglio a freddo da un profilo estruso tubolare di forma rettangolare e rettificati dimensionalmente ad un centro di lavoro per garantire un accoppiamento di forma efficace con la slitta. I due blocchetti possono quindi essere posizionati ad una distanza relativa l'uno da l'altro che può variare da 400mm a 10mm. Su un blocchetto sarà quindi fissata in modo solidale il supporto per l'alloggiamento per il MultiWells presentato in figura 66 diviso in due parti: la base (in giallo) che può essere fissata al blocchetto in alluminio sia nella parte superiore che inferiore per mezzo di 2 viti filettate M3 che la bloccano attraverso un'asola che ne permette un movimento relativo lungo X; ed una parte (in verde) che svolge il compito di comprimere il MultiWells in modo da garantirne la tenuta stagna e che riporta sul suo lato esterno due tacche di centraggio per il puntatore laser e riferimento di allineamento corretto del fascio ad ultrasuoni sul pozzetto bersaglio. Il fatto che questo componente sia invertibile "up-side down" riduce le posizioni che la sonda deve assumere per stimolare tutti e 4 i pozzetti bersaglio: infatti con l'inversione del MultiWells la sonda non cambia mai la sua posizione sull'asse Z, ma necessità solo di un grado di libertà lungo l'asse Y (Figura 66b, 66c, freccia rossa). Il supporto della sonda è invece composto da 3 parti: la base (in blu) che si fissa al blocchetto in alluminio e che può essere spostata lungo l'asse Y per cambiare bersaglio lungo la stessa riga del MultiWells; una

zona di collegamento o base laser che ha il compito di fissare la sonda e di garantire una distanza costante dal puntatore laser che sarà usato come riferimento esterno per gestire gli spostamenti laterali ed essere certi di centrare il pozzetto immerso con il fascio degli ultrasuoni.

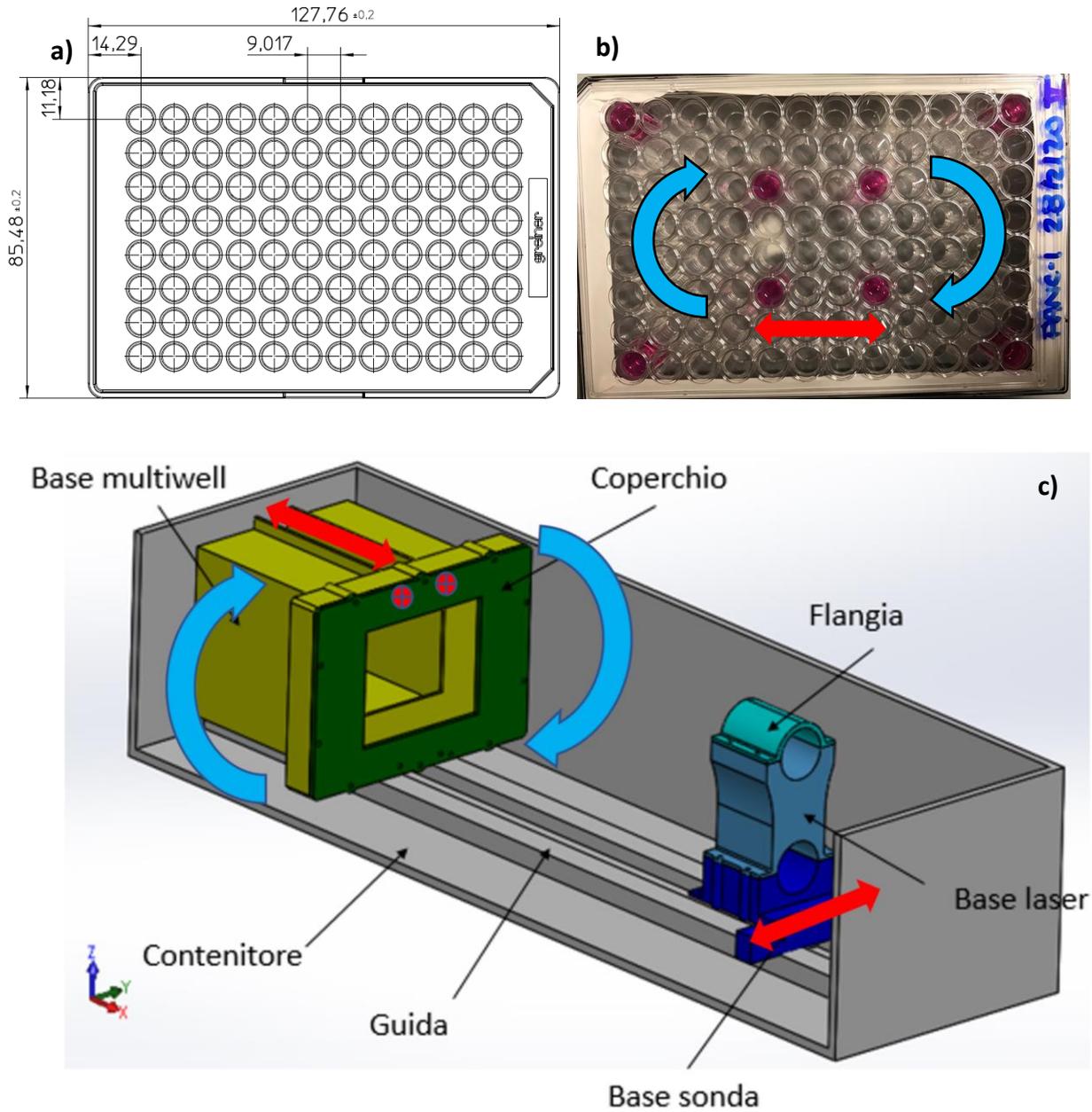


Figura 66: a) Dimensioni MultiWells da 96 pozzetti; b) MultiWells reale con culture cellulari posizionate per la stimolazione; c) Schema di funzionamento e rappresentazione 3D del setup e dei supporti per sonda ed il MultiWells per le culture cellulari.

4.4 CIRCUITO DI MATCHING GENERATORE E AMPLIFICATORE CON MASSIMO TRASFERIMENTO DI POTENZA

Il circuito di matching è un circuito ideato per progettare l'impedenza di ingresso di un carico elettrico per massimizzare il trasferimento di potenza e di conseguenza minimizzare la riflessione del segnale dal carico. Di solito questo circuito è composto da componenti attivi e reattivi, in modo da compensare l'effetto energetico. Il generatore utilizzato nel sistema di stimolazione è un MS-9160 della Universal system con resistenza di uscita di 50Ω . La parte reale e immaginaria dell'impedenza elettrica del trasduttore (Z_T) è data dal produttore, i risultati sono riportati in Tabella 11. A causa della bassa impedenza elettrica del trasduttore WS75-2 ($Z_T = 7 - j130 \Omega @ 1 \text{ MHz}$), non è stato necessario integrare un circuito di matching ma è stato utilizzato un amplificatore di potenza lineare a larghezza di banda 15 MHz (@ -3dB), sviluppato all'Università di Firenze (UNIFI); amplificatore per massimizzare il trasferimento di potenza al trasduttore ultrasonico, con resistenza di uscita comparabile con la resistenza del trasduttore ($R_{out} = 0.92 \Omega @ 1 \text{ MHz}$).

L'approccio progettuale si è orientato verso un amplificatore a tre stadi con lo stadio finale costituito da un amplificatore a ponte (bridge) con una grande capacità di pilotaggio di corrente per mezzo dell'utilizzo di due array di buffer di potenza in parallelo. L'uscita differenziale raddoppia la tensione di uscita disponibile e la realizzazione di due rami dell'amplificatore, connettendo in parallelo N buffer di potenza, ha permesso di ottenere la corrente max in uscita (*N) ed ha diminuito l'impedenza di uscita (/N). Questo amplificatore, rappresentato nella Figura 67, è stato specificamente progettato per l'applicazione in test non distruttivi ad ultrasuoni, con impedenza di uscita molto bassa, ottima linearità e bassa distorsione. Pertanto, per la sonda utilizzata non è stato necessario migliorare l'adattamento elettrico tra la sorgente e il trasduttore.

Grazie all'uso di questo amplificatore, rispetto ai commerciali amplificatori a banda larga comunemente utilizzati in accoppiamento di questo sonde, è stato possibile ottenere un campo di pressione ultrasonora nettamente più elevato a parità di consumo energetico.



Figura 67: Amplificatore di potenza lineare a larghezza di banda 15 MHz, sviluppato all'Università di Firenze (Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione) specificamente progettato per applicazioni ad ultrasuoni, con impedenza di uscita molto bassa e bassa distorsione del segnale amplificato.

Caratteristiche principali dell'amplificatore.

- Guadagno in ampiezza= 25dB @100k kHz
- $B_{3db} = 20$ MHz con bassa impedenza R_L da 5.6 Ohm a 120 Ohm.
- $V_{out\ max} = 60\ V_{pp}$ ($R_L = 120$ Ohm)
- $V_{out\ max} = 52\ V_{pp}$ ($R_L = 5.6$ Ohm).
- $I_{out\ max} = 4.65\ A$
- THD (5 harmonics) <3.5% @ 15 MHz
- THD (2 harmonics) <2% @ 15 MHz

WS75-2	FREQUENZA	RE (Z_T) [Ω]	IM (Z_T) [Ω]
	1	7	-130
	2	11	-67
	3	4	-46

Tabella 11: parte reale e immaginaria dell'impedenza elettrica del trasduttore (Z_T) misurata con un analizzatore di rete vettoriale

Per poter calcolare i parametri quali la corrente e la potenza ceduta al trasduttore si è usata la rappresentazione elettronica equivalente del trasduttore precedentemente descritta. Il circuito completo ottenuto è il seguente:

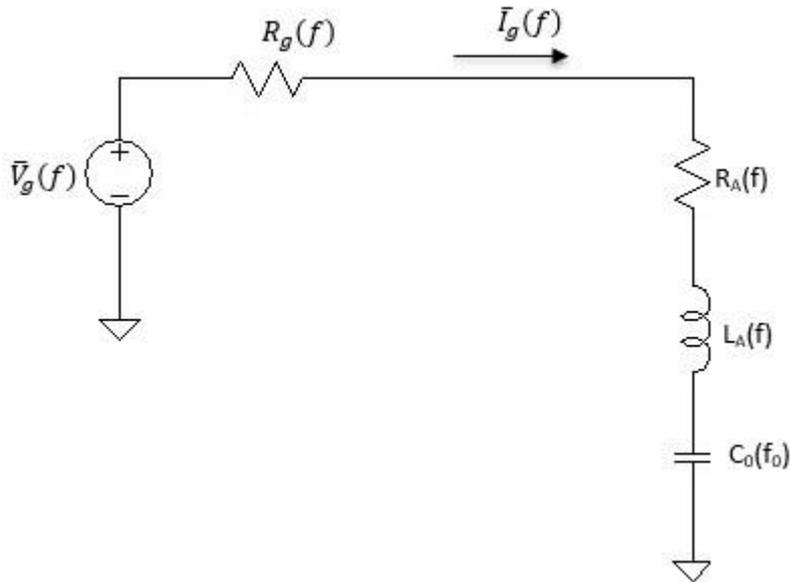


Figura 68: Schema elettrico di funzionamento dell'amplificatore di potenza

Dove $\bar{V}_g(f)$ è la tensione che verrà applicata sul trasduttore, $R_g(f)$ è la resistenza interna del generatore o meglio la resistenza di uscita dell'amplificatore. $\bar{I}_g(f)$ è la corrente che circola nel circuito, $R_A(f)$, $L_A(f)$, $C_0(f_0)$ sono rispettivamente la resistenza, l'induttanza e la capacità intrinseche del trasduttore. Dai parametri precedentemente introdotti si ha che:

$$\bar{Z}_T(f) = R_A(f) + j \left[X_A(f) - \frac{1}{2\pi f C_0} \right] \quad 72.$$

Che rappresenta l'impedenza totale del circuito. Lavorando alla frequenza nominale del trasduttore avremo che $X_A(f) = 0$ e conoscendo l'impedenza del trasduttore è possibile ricavare la Potenza attiva nel circuito. La Potenza attiva del circuito è data dalla parte reale della corrente che circola nel circuito che moltiplica la resistenza $R_A(f)$:

$$P_A(f) = \text{Re}^2\{\bar{I}_g(f)\} \cdot R_A(f) \quad 73.$$

La capacità del piezoelettrico che è dipendente dalla frequenza:

$$C_0 = \frac{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot A}{d} \quad 74.$$

$$f_0 = c/2d \quad 75.$$

Dove A è la superficie della parte attiva del trasduttore, ϵ_0 è la costante dielettrica del vuoto, e c è la velocità del suono nel materiale piezoelettrico. $K_T = 0.32$ è il coefficiente di accoppiamento elettromeccanico; ϵ è la costante dielettrica del Metaniobato di Piombo (PbNb_2O_6) ed è dato da 3 diversi valori a seconda della frequenza:

$$\epsilon_1 = 64.9 \text{ per } f=1\text{MHz} \quad 76.$$

$$\epsilon_2 = 65.1 \text{ per } f=2\text{MHz} \quad 77.$$

$$\epsilon_3 = 68.0 \text{ per } f=3\text{MHz} \quad 78.$$

L'impedenza totale del circuito è data da:

$$\bar{Z} = R_g + \bar{Z}_T = 0.92 + 7 - j130 = (7.92 - j130)\Omega \quad 79.$$

Dove l'impedenza elettrica della sonda è stata trovata in letteratura¹². Si avrà quindi:

$$P_A(f) = Re^2\{\bar{I}_g(f)\} \cdot R_A(f) = Re^2\left\{\frac{\bar{V}_g(f)}{\bar{Z}(f)}\right\} \cdot R_A(f) = Re^2\left\{\left[\frac{25/\sqrt{2}}{(7.92-j130)}\right]\right\} \cdot R_A(f) =$$

$$Re^2\{(8.253 \cdot 10^{-3} + j0.1355)\} \cdot 7 = (8.253 \cdot 10^{-3}A)^2 \cdot 7 \Omega = 0.48 \cdot 10^{-3} W \quad 80.$$

$\bar{V}_g(f)$ è la tensione che è stata misurata dall'oscilloscopio in uscita all'amplificatore. L'amplificazione dell'onda in ingresso all'amplificatore di 3 V Picco-picco è stata di un fattore 24.44 dB portando l'ampiezza dell'onda sinusoidale in ingresso alla sonda a 50 V picco picco. $P_A(f)$ è la Potenza elettrica dissipata sulla resistenza R_A lavorando ad una frequenza vicina alla frequenza di risonanza del trasduttore, ovvero per $f = 1\text{MHz}$. Questa potenza calcolata è la stima della potenza elettrica ceduta alla sonda che è formata da due componenti P_{AD} e P_{ap} , rispettivamente la potenza meccanica dissipata nel cristallo e la potenza emessa come campo acustico nel mezzo di propagazione.

4.5 CALIBRAZIONE CON IDROFONO AD IMMERSIONE

In questo paragrafo vengono analizzati i parametri del campo di pressione generati dal sistema di stimolazione progettato, successivamente verranno confrontati con i dati forniti da The Ultrason Group Spa Group. I valori di pressione media della sonda US sono stati misurati con un idrofono (0.25 – 20 MHz frequency range, Sensibilità: 282nV/Pa, HGL 0400 series della Onda). La misurazione è stata eseguita tramite un sistema meccanico che permette spostamenti solo lungo l'asse longitudinale del fascio ultrasonico, con fissaggio tramite bulloni e scorrimento lungo una guida lineare meccanica in

alluminio. Le misurazioni sono state effettuate con una distanza dal traduttore iniziale di 80mm fino ad arrivare ad una distanza di 150mm con passo di 10mm. Per effettuare la prima procedura di collimazione del fascio di ultrasuoni con la punta l'idrofono è stato utilizzato un puntatore laser; successivamente il puntatore è stato sostituito con la sonda.

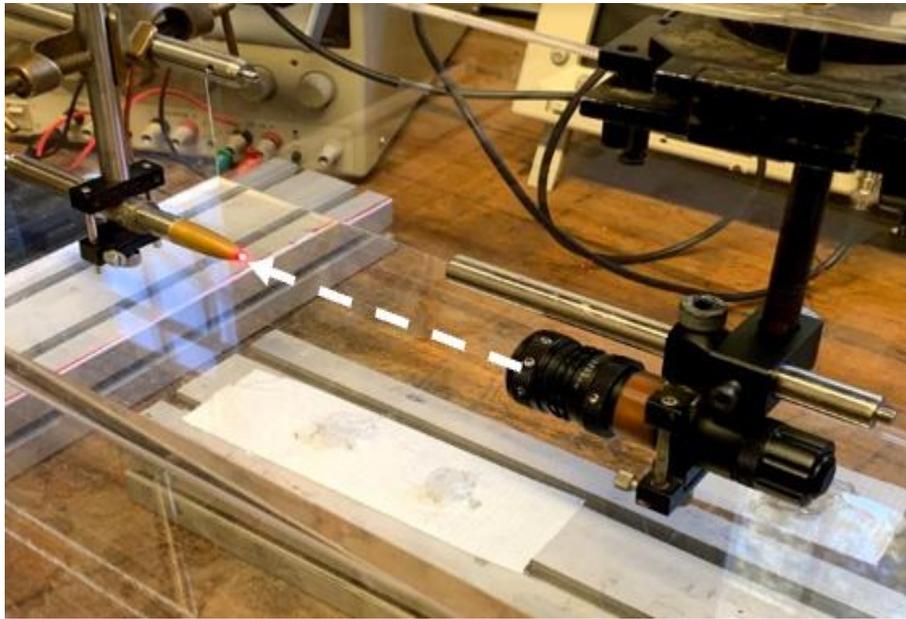


Figura 69: Setup per la registrazione delle distanze fuocali del fascio ultrasonoro generato dalla sonda in accoppiamento con l'amplificatore a banda stretta progettato dal Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione. A destra il puntatore laser posizionato sulla slitta lineare con cui si fa collimare l'asse longitudinale di propagazione del fascio ultrasonoro della sonda con la punta dell'idrofono.

I valori misurati dall'idrofono sono riportati nella Tabella 12:

80	90	100	110	120	130	140	150	distanza [mm]
710	720	660	670	660	640	690	690	tensione picco-picco[mV] 1MHz
1000	900	1120	1110	1120	1130	1090	1080	tensione picco-picco[mV] 2MHz
1450	1440	1410	1360	1340	1270	1280	1290	tensione picco-picco[mV] 3MHz

Tabella 12: Valori di tensione misurata su punti presi lungo l'asse longitudinale della fascio ultrasonoro a diverse distanze dalla superficie della sonda.

Tramite la sensibilità dell'idrofono, sono stati ottenuti i valori di pressione sviluppati dal sistema, e questo ha permesso di ottenere la pressione [Pa] picco-picco incidente sul coperchio del MultiWells che sono riportati di seguito nella Tabella 13:

80	90	100	110	120	130	140	150	distanza [mm]
1,25e+06	1,27e+06	1,17e+06	1,18e+06	1,17e+06	1,13e+06	1,16e+06	1,15e+06	[Pa] a 1MHz
1,60e+06	1,99e+06	1,97e+06	1,99e+06	1,97e+06	2,04e+06	1,91e+06	1,60e+06	[Pa] a 2MHz
2,57e+06	2,55e+06	2,50e+06	2,41e+06	2,38e+06	2,25e+06	2,27e+06	2,29e+06	[Pa] a 3MHz

Tabella 13: Valori di pressione picco-picco convertiti tramite la sensibilità dell'idrofono alle frequenze specifiche utilizzate, in giallo i valori corrispondenti alla zona di focalizzazione naturale del fascio fuori dal NearField.

Si nota che i valori del campo di pressione generati a parità di ampiezza di segnale risultano ben più elevati rispetto a quelli utilizzati con configurazioni con amplificatori a banda larga[58]. E' quindi evidente che con l'amplificatore realizzato si ha una miglior efficienza di lavoro della sonda ad US. Per descrivere l'andamento del campo di pressione occorre aver presente una serie di considerazioni riguardanti il Near field ed il Far field per stimolazioni ad onde continue LICU:

- L'andamento dell'ampiezza della pressione acustica nel near field è molto irregolare e difficilmente rappresentabile.
- La pressione divergente nel far field ha un andamento in ampiezza molto più regolare e decrescente con la distanza

Sono stati comparati i valori di pressione del fornitore rispetto a quelli sviluppati dal sistema progettato per identificare la distanza di stimolazione che massimizzasse il campo di pressione acustica alle varie frequenze (figure 70, 71, 72).

- Stimolazione ad 1 MHz

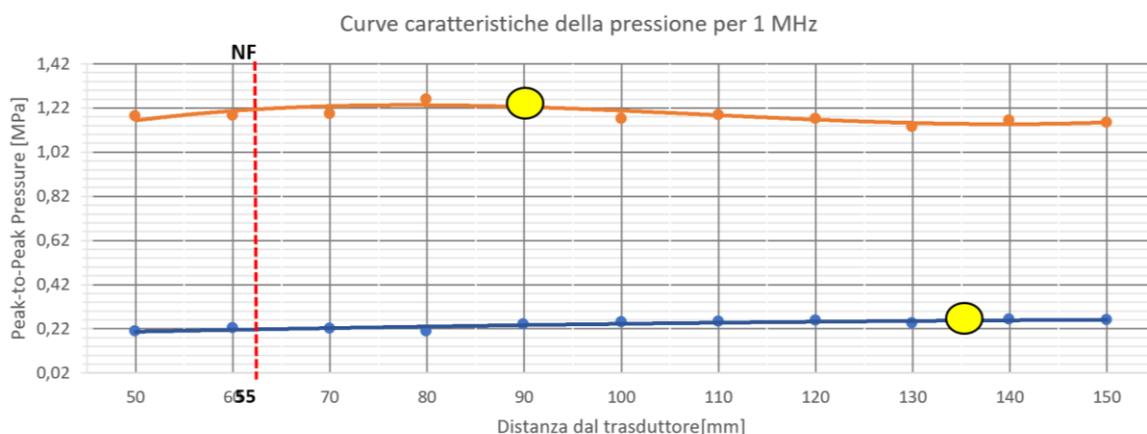


Figura 70: Curve di caratterizzazione dei campi di pressione sviluppati dal sistema progettato presso Unifi (in arancione) ed il sistema utilizzato dal fornitore The Ultran Group Spa (in blu). I fuochi relativi alle due configurazioni sono evidenziati in giallo.

Per la stimolazione ad 1 MHz è stato scelto come distanza focale per la stimolazione un valore di 90mm dal trasduttore. Si può notare come questo punto si trovi nel Far field, infatti:

$$z_R = \frac{a^2}{\lambda} = \frac{a^2 f}{c} = 55mm \quad 81.$$

- Stimolazione a 2 MHz

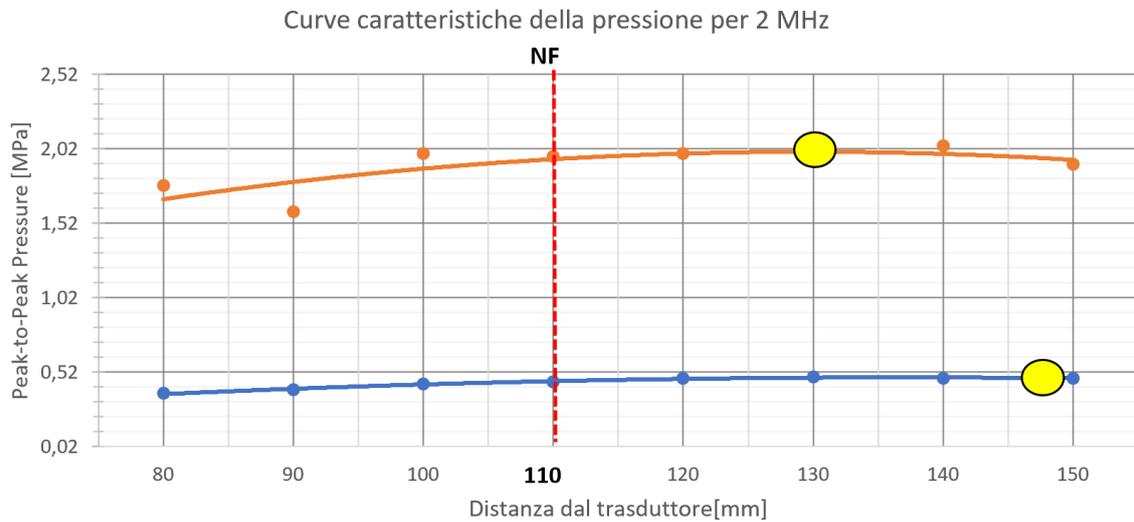


Figura 71: Curve di caratterizzazione dei campi di pressione sviluppati dal sistema progettato presso Unifi (in arancione) ed il sistema utilizzato dal fornitore The Ultran Group Spa (in blu). I fuochi relativi alle due configurazioni sono evidenziati in giallo.

Per la stimolazione a 2 MHz si può notare come le misure sono state prese nell'intorno della distanza di Rayleigh (110mm), infatti nel grafico sono presenti punti che danno un andamento irregolare e che distano in modo considerevole dalla curva di interpolazione (80, 90 e 100mm). Il punto scelto per la stimolazione è ad una distanza di 120mm dal traduttore.

- Stimolazione a 3 MHz

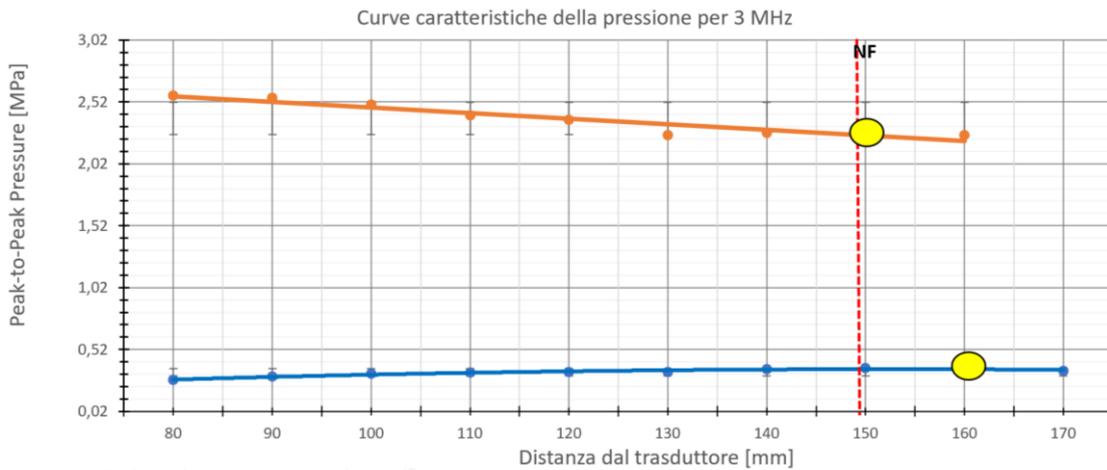


Figura 72: Curve di caratterizzazione dei campi di pressione sviluppati dal sistema progettato presso Unifi (in arancione) ed il sistema utilizzato dal fornitore The Ultran Group Spa (in blu). Frequenza di stimolazione: 3 MHz. Il punto scelto per la stimolazione è ad una distanza di 150 mm dal trasduttore. Il centro fuoco (in giallo) valutato dal fornitore era ad una distanza di 157.5mm

Per la stimolazione a 3 MHz i punti misurati dall'idrofono si trovano nel near field, infatti $z_R=165\text{mm}$. L'unico punto che è posizionato nell'intorno della distanza di Rayleigh è 150mm che è stato scelto come punto ottimale per le stimolazioni future. Per il calcolo dell'intensità sono state fatte una serie di considerazioni:

- La differenza fra le impedenze acustiche dell'acqua e del coperchio del MultiWells generano una riflessione dell'onda di pressione che si può valutare con la seguente formula:

$$\frac{p_i}{p_t} = T = 1 - \frac{(Z_p - Z_a)}{(Z_p + Z_a)} = 0.62845 \quad 82.$$

Dove p_i e p_t sono rispettivamente la pressione incidente sul coperchio del MultiWells e la pressione trasmessa attraverso il coperchio. T è il coefficiente di trasmissione. Z_p e Z_a sono rispettivamente l'impedenza acustica del coperchio (3.23 MRayls) e dell'acqua (1.48 MRayls).

- L'attenuazione del fascio sonoro attraverso il coperchio sarà minima e si può valutare tramite la seguente formula:

$$p(x) = p(0)e^{-\alpha \cdot x} \quad 83.$$

dove $\alpha = 1.1 \frac{\text{dB}}{\text{cm} \cdot \text{MHz}}$ è il coefficiente di attenuazione del PMMA, x è la distanza percorsa dal fascio attraverso il materiale, $p(0)$ la pressione iniziale e ricordando che:

$$I_{sata} = \frac{\int_{area\ del\ fascio} I_{ta} dA}{\int_{area\ del\ fascio} A} \frac{W}{m^2} \quad 84.$$

Con queste considerazioni è stata calcolata la pressione acustica esercitata sugli sferoidi e l'intensità acustica di picco:

$$I_{SATA\ 1} = 1.167 \frac{W}{cm^2} \quad 85.$$

$$I_{SATA\ 2} = 2.275 \frac{W}{cm^2} \quad 86.$$

$$I_{SATA\ 3} = 2.431 \frac{W}{cm^2} \quad 87.$$

Dove I_1 , I_2 , I_3 sono le intensità che agiscono sullo sferoide rispettivamente alle 3 frequenze di indagine ed attenuate dal coperchio in PMMA del 96MultiWells.

Per tentare di predire la probabilità che si verifichino fenomeni di cavitazione viene utilizzato l'Indice Meccanico (IM) che è la risultante del rapporto fra il picco di pressione acustica negativa (misurata in MPa) e la radice quadrata della frequenza (misurata in MHz):

$$IM_1 = 1,27 \quad IM_2 = 1,41 \quad IM_3 = 1,31 \quad 88.$$

L'FDA limita l'IM massimo a 1.9 per evitare l'insorgenza di microbolle che possono causare effetti cavitazionali stabili o instabili come già descritto nei precedenti capitoli.

In figura 73 si riporta il setup completo con il diagramma a blocchi per la gestione ed il controllo che riassume quanto descritto in questo capitolo e che evidenzia come le soluzioni e le scelte fatte sino ad ora portino a gestire con semplicità anche da un singolo ricercatore l'intera sessione sperimentale senza rischio di compromettere la qualità dei risultati. Inoltre la modularità del sistema permette di modificare, sostituire o implementare ogni sua parte senza comprometterne il funzionamento.

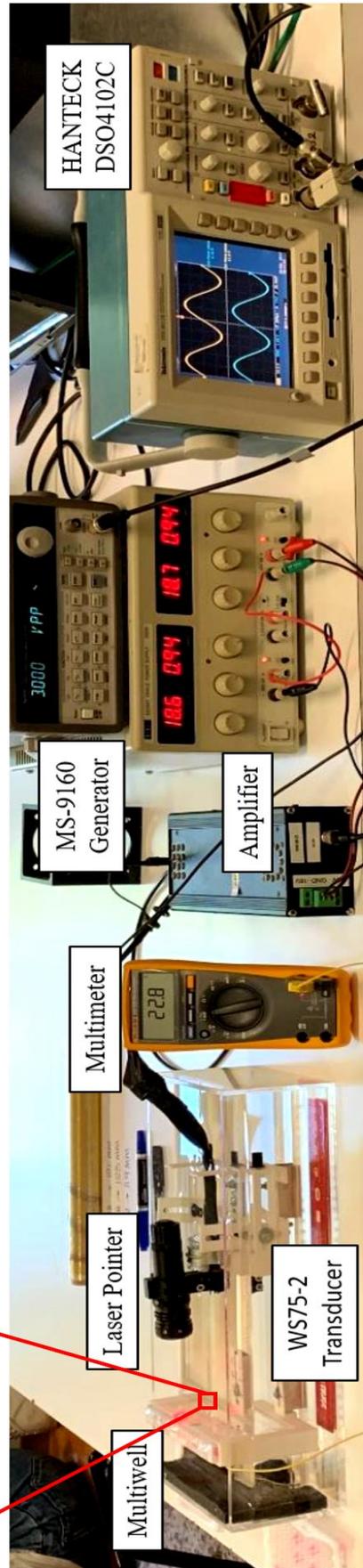
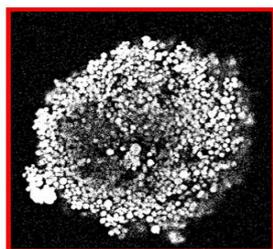
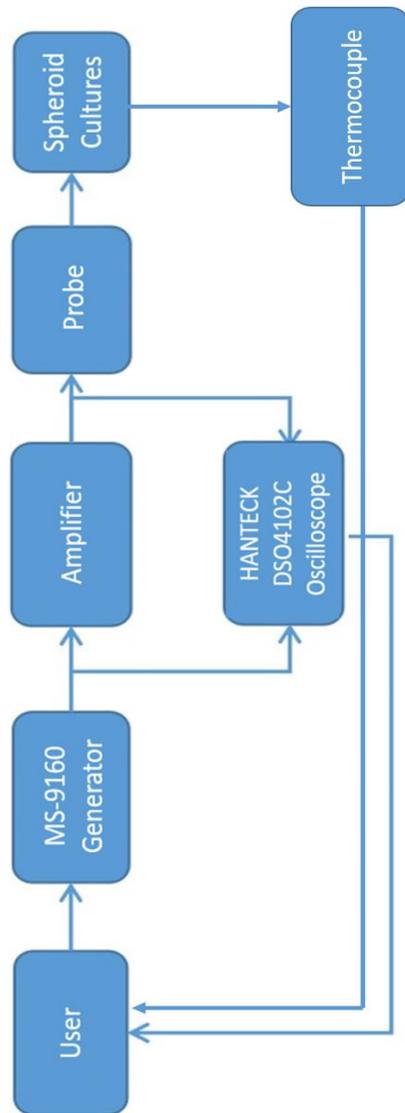


Figura 73: Diagramma a blocchi del funzionamento del setup e configurazione sperimentale definitiva

CAPITOLO 5

STIMOLAZIONE LICU IN VITRO DI SFEROIDI CELLULARI TUMORALI PANC-1

In questo capitolo viene dettagliato il protocollo sperimentale che ha visto coinvolti 3 gruppi di ricerca appartenenti a 3 dipartimenti, a cui è stato assegnato un ruolo ben definito e le sue responsabilità per non compromettere l'affidabilità dei risultati che saranno presentati. In particolare, il gruppo di ricerca della Professoressa Annarosa Arcangeli appratente al Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica (DMSC) si è occupato della semina e dell'accrescimento degli sferoidi secondo la disposizione che ho individuato ottimale in base a tutte le considerazioni sino ad ora dettagliate; al gruppo di ricerca a cui appartengo, diretto dal Professor Andrea Corvi, appartenente al Dipartimento di Ingegneria Industriale (DIEF) è affidato il compito di coordinare l'intera attività e si è occupato in prima persona del prelievo, della conservazione e della stimolazione con la preziosa collaborazione del gruppo di ricerca del Professor Lorenzo Capineri che appartiene al Dipartimento di Ingegneria dell'informazione e che ha messo a disposizione i dispositivi per il controllo strumentale ed il monitoraggio dei parametri termoacustici presso il laboratorio ad US di controlli non distruttivi; infine sempre al gruppo della Professoressa Arcangeli è stato affidato il compito delle analisi a fluorescenza post trattamento LICU per caratterizzarne l'efficacia . L'obiettivo di questo capitolo è quindi quello di validare il protocollo simulato con l'analisi agli elementi finiti e dettagliare i risultati sperimentali ottenuti.

5.1 PROCESSO DI INCUBAZIONE E POSIZIONE DEGLI SFEROIDI

Nella sperimentazione è stato scelto di utilizzare colture cellulari in 3D. Una coltura cellulare 3D permette alle cellule in vitro di crescere in tutte le direzioni, simile a come farebbero in vivo tenendo conto anche delle interazioni complesse della matrice extracellulare (ECM), dei gradienti intratumorali in pH, ossigeno e sostanze nutritive, quindi una maggiore proliferazione cellulare.

Per ogni test, sono state utilizzate cellule PANC-1, derivanti da adenocarcinoma duttale pancreatico. Le cellule sono state regolarmente coltivate in un'incubatrice umidificata a 37°C con il 5% di CO₂ che utilizza il DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (Euroclone) integrato con 4 mM L-Gln (Glutamine) e 10% FBS (Fetal Bovine Serum) siero (Euroclone). Per le colture di sferoidi 3D, le cellule sono state staccate con la trypsin e contate usando il blu trypan. 103 cellule sono state seminate su uno strato di base di agarose (1,5g/l) in 96 pozze tamponamento e coltivate per 96 ore in un'incubatrice umidizzata a 37 gradi centigradi e 5% di CO₂.

Tutti e quattro gli sferoidi per ogni frequenza di stimolazione sono stati trattati per 15 minuti. Prima di procedere con ogni stimolazione, sono state acquisite le temperature iniziali dell'acqua contenuta nel serbatoio, il piezoelettrico e i pozzi contenenti le colture bersaglio. Le stesse acquisizioni sono state ripetute ogni 5 minuti fino alla fine del trattamento per un totale di cinque acquisizioni, al fine di verificare un aumento termico inferiore a 2 gradi centigradi al punto di riferimento.

Il MultiWells, per ridurre gli shock termici durante il trasporto tra laboratori viene posto all'interno di un box di materiale termoisolante.

Il posizionamento degli sferoidi nel MultiWells ha ricoperto un punto cruciale infatti si è deciso di posizionare i 4 sferoidi da stimolare al centro del MultiWells, ad una distanza sufficiente per impedire la sovrapposizione degli effetti durante le varie stimolazioni: effettuando una sezione sul piano XZ del fascio nel punto di fuoco naturale si è estratto il profilo di pressione spaziale ed è stata individuata la distanza dall'asse centrale in cui la pressione acustica avesse valori prossimi allo zero (figura 74a). Nei pozzetti ai quattro vertici del MultiWells sono stati collocati gli sferoidi del gruppo di controllo, ad una distanza ancora maggiore di quella tra gli sferoidi da trattare: questa soluzione (figura 74b) è stata adottata per essere sicuri che le condizioni al contorno di tutti gli sferoidi sia trattati che di controllo si mantenessero le stesse durante tutto il periodo, ciò ci permetterà di asserire che, in caso di presenza di cellule morte nell'analisi a fluorescenza post-trattamento, queste possano essere ricondotte solo agli effetti prodotti dalla stimolazione ad ultrasuoni.

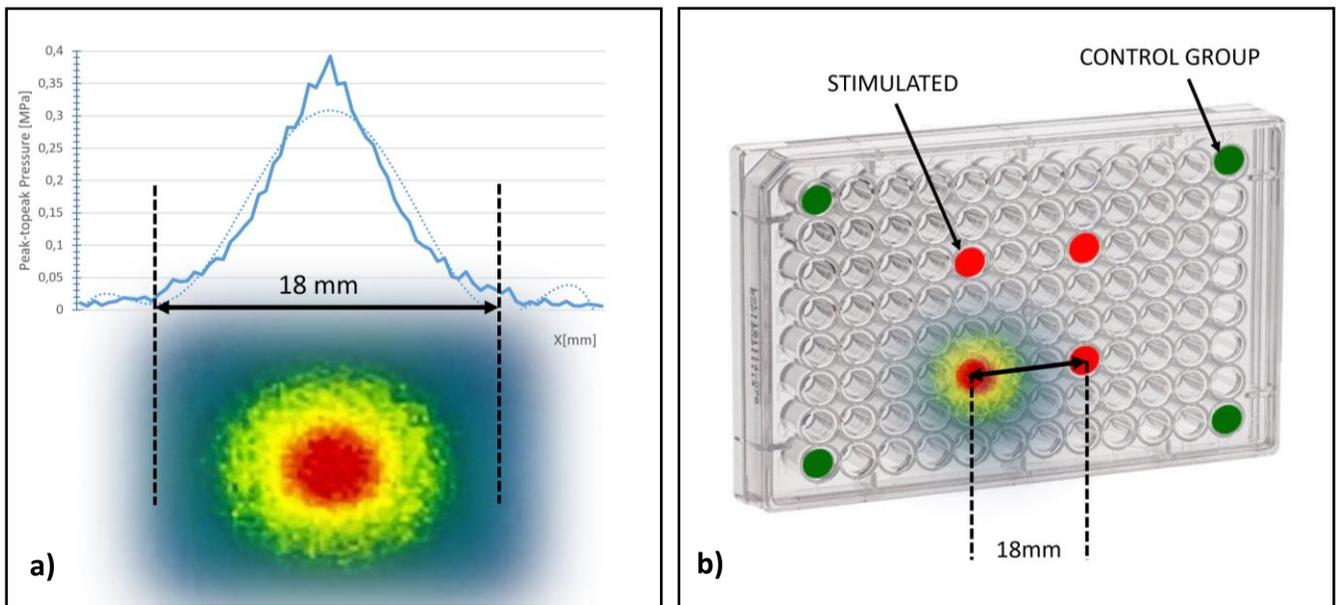


Figura 74: a) Curva di pressione sul piano di sezione XZ del fascio ultrasonoro a 1 MHz; b) Sovrapposizione del campo di pressione per il posizionamento degli sferoidi nel MultiWells.

Inoltre come già presentato nel capitolo precedente la posizione degli sferoidi risulta simmetrica rispetto alle linee di mezzeria e questo permette di attuare la strategia di ribaltamento del MultiWells per ridurre il numero di puntamenti del fascio a 2 posizioni piuttosto che eseguirne 4 incrementando la possibilità di commettere errori di allineamento.

5.2 PROTOCOLLO DI STIMOLAZIONE LICU

Una volta predisposti gli sferoidi nella configurazione ottimale per evitare la sovrapposizione della del fascio ultrasonoro è stato delineato passo passo il protocollo ottimale da seguire per la prima stimolazione (posizioni F8, C5, F5, C8 del MultiWells) si è scelta una durata stimolazione di 15 minuti alla frequenza di 1 MHz in posizione focale alla distanza di 90mm dalla sonda dove

l'intensità acustica raggiunge il suo massimo che corrisponde a:

$$I_{SATA 1} = 1.167 \frac{W}{cm^2} \quad 89.$$

Si ripercorrono di seguito i passi al fine di rendere riproducibile e ripetibile la sperimentazione:

- 1) Controllo collegamenti e cablaggio dei vari componenti del setup
- 2) Riempimento della vasca con acqua a temperatura ambiente 20°C
- 3) Inserimento del MultiWells;
- 4) Accensione generatore di onde sinusoidali (settaggio della frequenza di trattamento 1 MHz, ed impostazione dell'ampiezza del segnale a 3 Volt picco-picco
- 5) Accensione oscilloscopio

- 6) Posizionamento del supporto del MultiWells alla distanza focale della frequenza di stimolazione
- 7) Verifica collimazione fascio ultrasuoni con pozzetto bersaglio con puntatore laser
- 8) Accensione ed impostazione dell'alimentatore dell'amplificatore differenziale a 17.8 v (deve essere minore di 18 V) per entrambi i canali
- 9) Controllo dell'amplificazione della lettura della sonda collegata al canale 2 dell'oscilloscopio a x10 (essendo la sonda di tipo attenuata). Circa 50 Volt picco picco.
- 10) Accensione multimetro collegato ad una termocoppia
- 11) Lettura temperatura dell'acqua dietro la sonda, sul piezoelettrico ed in prossimità del pozzetto in stimolazione (ogni 5 minuti)
- 12) Al termine dei 15 minuti spegnimento dell'alimentatore dell'amplificatore
- 13) Posizionamento sonda sul prossimo sferoide da trattare
- 14) Terminata la stimolazione dei 4 pozzetti centrali estrazione del MultiWells dall'alloggiamento, asciugatura con carta assorbente e collocamento nel Box in polistirene per il trasporto al laboratorio Biologico.

Le temperature della prima stimolazione sono riportate nella tabella 14:

pozzetto F8	T (C°) (ambiente)	T(C°) (superficie sonda US)	T(C°) (pozzetto)
0	18,8	18,8	18,8
5	18,8	18,8	19,3
10	19,0	19,5	19,1
15	19,0	19,2	19,1
pozzetto C5			
0	18,8	19,0	18,9
5	18,8	19,3	19,0
10	18,8	19,2	19,0
15	18,9	19,3	18,9
pozzetto F5			
0	18,9	19,1	19,2
5	19,2	19,4	19,2
10	19,2	19,6	19,3
15	19,3	19,6	19,2
pozzetto C8			
0	19,1	19,3	19,2
5	19,2	19,5	19,2
10	19,2	19,5	19,3
15	19,2	19,7	19,3

Tabella 14: Temperature acquisite durante le stimolazioni a 1 MHz in vari punti del setup ogni 5 minuti di trattamento

Ultimata la stimolazione del primo MultiWells si procede con il secondo MultiWells con la stessa procedura sopradescritta e mantenendo invariato il tempo di stimolazione degli sferoidi, ma cambiando il parametro della frequenza e di conseguenza il valore dell'intensità acustica che a 2 MHz corrisponde nel piano focale a:

$$I_{SATA 2} = 2.275 \frac{W}{cm^2} \quad 90.$$

pozzetto C8	T (C°) (ambiente)	T(C°) (superficie sonda US)	T(C°) (pozzetto)
0	19,2	19,4	19,4
5	19,4	20,9	19,5
10	19,4	20,9	19,5
15	19,4	20,6	19,5
pozzetto F5			
0	19,3	19,7	19,5
5	19,4	20,8	19,5
10	19,4	20,7	19,6
15	19,4	20,9	19,6
pozzetto F8			
0	19,7	19,9	19,8
5	19,8	21,2	20,0
10	19,8	21,4	20,1
15	19,9	21,2	20,1
pozzetto C5			
0	19,9	20,1	19,9
5	19,9	21,4	20,0
10	19,9	21,5	20,1
15	19,8	21,4	20,0

Tabella 15: Temperature acquisite durante le stimolazioni a 2 MHz in vari punti del setup ogni 5 minuti di trattamento

Allo stesso modo si è proceduto per l'ultimo MultiWells della sessione sperimentale andando a mantenere fissati i tempi di esposizione agli ultrasuoni ma variando la frequenza operativa del segnale a 3 MHz con la rispettiva intensità acustica:

$$I_{SATA 3} = 2.431 \frac{W}{cm^2} \quad 91.$$

pozzetto F8	T (C°) (ambiente)	T(C°) (superficie sonda US)	T(C°) (pozzetto)
0	20,0	20,2	20,2
5	20,1	22,0	20,5
10	20,1	22,2	20,5
15	20,2	22,3	20,6
pozzetto C5			
0	20,7	21,3	20,8
5	20,7	22,5	21,1
10	20,6	22,4	21,0
15	20,7	22,6	21,1
pozzetto C8			
0	20,6	20,8	20,8
5	20,7	22,5	20,7
10	20,6	22,3	21,0
15	20,5	22,5	20,9
pozzetto F5			
0	20,4	20,8	20,5
5	20,4	22,2	20,8
10	20,3	22,0	20,7
15	20,2	22,0	20,6

Tabella 16: Temperature acquisite durante le stimolazioni a 3 MHz in vari punti del setup ogni 5 minuti di trattamento

Anche in queste prove è stato verificato che l'incremento di temperatura è nei limiti dei 2°C, il che ci porta a concludere che gli eventuali risultati biofisici o biomeccanici indotti negli sferoidi trattati dalle prove effettuate con questo protocollo non possono essere attribuiti ad effetti di ipertermia. Al termine della procedura di stimolazione i MultiWells sono stati confezionati nei contenitori isolanti e portati presso il laboratorio di analisi Biologica del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica per poter verificare il grado di efficacia del trattamento in termini mortalità cellulare ed eventuale individuazione di altri effetti correlati al protocollo ad US adottato. Tutte le 8 sessioni sperimentali effettuate hanno seguito in modo rigoroso lo stesso protocollo appena descritto ed hanno condotto ai risultati che saranno illustrati nel prossimo capitolo.

5.3 INDAGINE ISTOLOGICA CON MARCATORI A FLUORESCENZA

Il periodo di test sperimentali è stato gravato dalla pandemia COVID-19 che ha complicato notevolmente tutte le procedure di accesso ai laboratori necessari al completamento di ogni singola sessione sperimentale. A partire dallo scongelamento delle cellule, per passare alla fase di semina nel terreno di cultura, attraverso il controllo dell'incubazione per la costituzione degli agglomerati sferoidali 3D che è stato curato interamente dal team della Prof. Annarosa Arcangeli del DMSC; successivamente il Multiwell con gli sferoidi maturi veniva trasportato nei laboratori del BIOLab per la messa a punto del setup di stimolazione e la predisposizione del Multiwell per la fase di immersione; infine grazie al supporto dell'USCNDLab si monitorava con i sensori di temperatura e l'idrofono ad immersione che la stimolazione ad US si svolgesse rispettando i protocolli imposti. Al termine della stimolazione ad US dei campioni, questi venivano trasportati nuovamente al DMSC per la valutazione sulla mortalità cellulare con microscopio a fluorescenza e la valutazione di eventuali altri effetti collaterali generati dal trattamento. Durante l'intensa attività sperimentale, in cui non sono mancati gli imprevisti, sono state portate a termine 8 sessioni per un totale di 192 sferoidi di PANC-1 analizzati di cui 96 trattati con gli US e altri 96 di controllo. Per ogni sessione sono stati utilizzati tre MultiWells da 96 pozzetti, uno per ogni frequenza di stimolazione, ognuno dei quali conteneva quattro sferoidi PANC-1 da trattare e quattro sferoidi PANC-1 di controllo.

Per l'evidenziazione a fluorescenza Calcein AM/PI, le cellule sono state marcate aggiungendo un nuovo mezzo contenente Calcein AM (2 g/mL) e PI (10 g/mL), incubate per 20 minuti e poi lavate con PBS. I campioni sono stati esaminati utilizzando un microscopio confocale SP8 (Leica, Wetzlar, Germania). Le immagini sono state acquisite utilizzando il software di acquisizione di immagini Leica LAS-X.

La mortalità risultante dal trattamento eseguito presso le tre diverse frequenze di stimolazione è stata valutata utilizzando il software Open source BioFilmAnalyzer, disponibile online (<https://bitbucket.org/rogex/biofilmanalyzer/downloads/>). Pertanto, a partire dalle immagini acquisite con un microscopio a fluorescenza confocale dopo la colorazione Calcein AM/PI, è stata quantificata la mortalità cellulare ottenuta come rapporto tra cellule rosse (cellule morte) e cellule verdi (cellule vive).

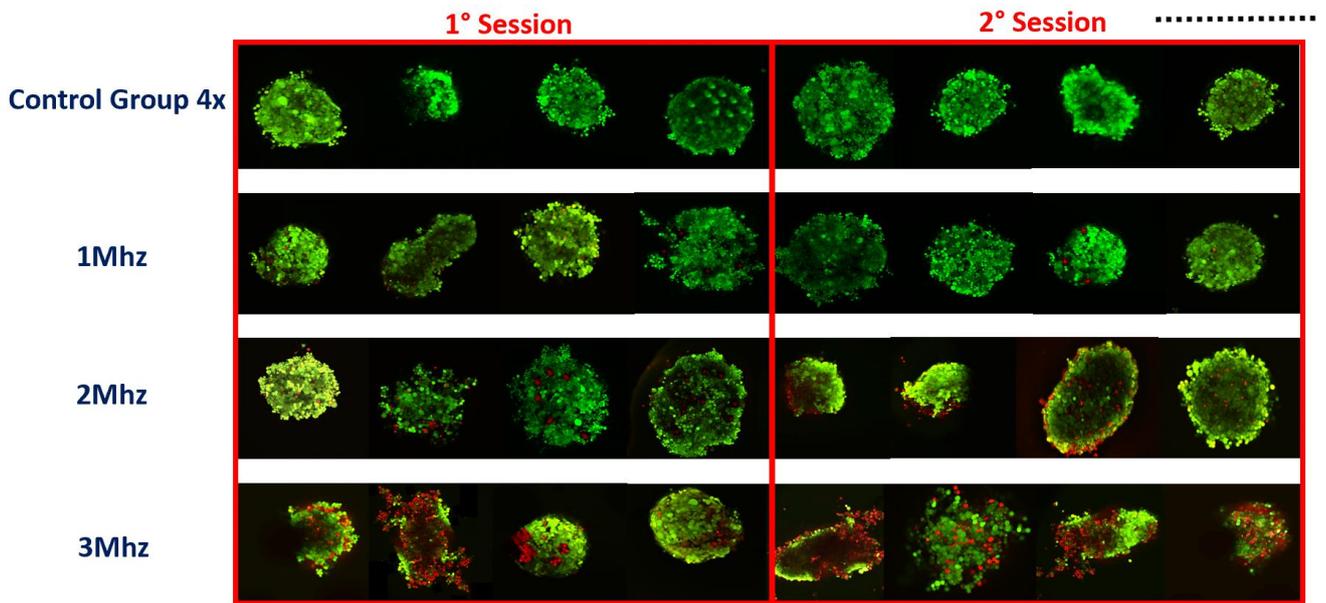


Figura 75: Report delle prime due sessioni sperimentali a confronto, visualizzazione qualitativa dell'aumento di cellule morte(marcate in rosso) e di cellule vive(marcate in verde) alle diverse frequenze di stimolazione.

Nella figura 75 sono riportate le immagini a fluorescenza delle prime 2 sessioni sperimentali suddivise per frequenza di trattamento utilizzata. Si può osservare che all'aumentare della frequenza il numero di cellule morte(rosse) incrementa notevolmente; altrettanto importante è il fenomeno di cambiamento morfologico dello sferoide fino alla completa disgregazione che avviene solo negli sferoidi trattati. Questo effetto biofisico che è generato dagli ultrasuoni deve essere ulteriormente approfondito per il seguente motivo: è fondamentale che, al momento della disgregazione dello sferoide, le cellule che lo compongono siano completamente morte per prevenire il rischio di metastasi ad altri organi.

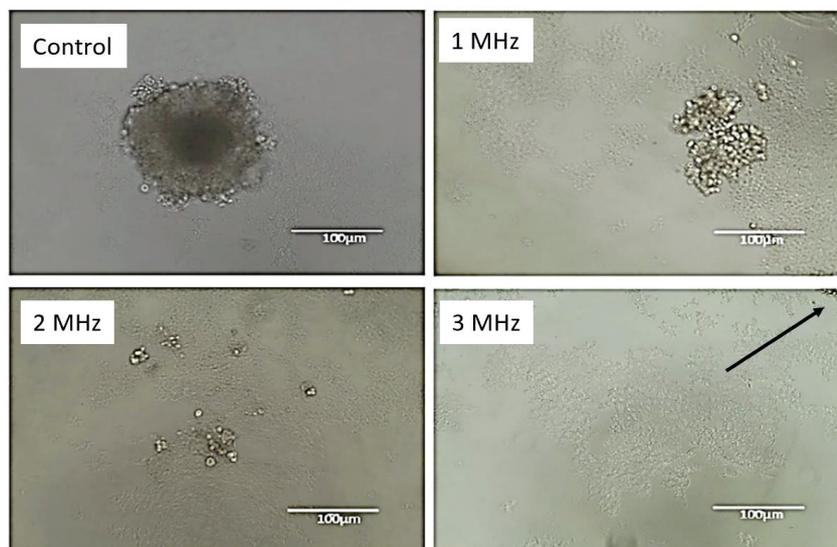
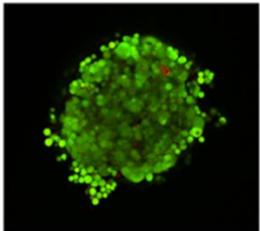
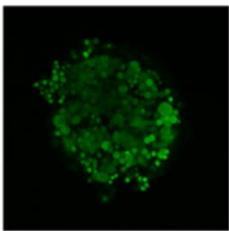
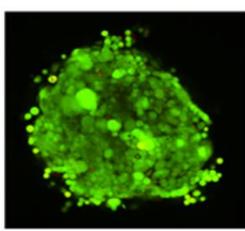
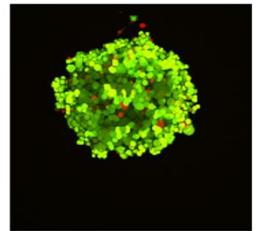
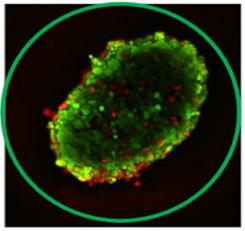
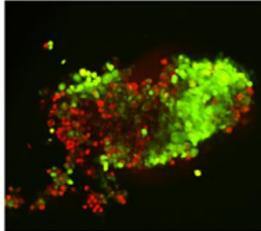


Figura 76: Immagine a microscopio ottico per di sferoidi che hanno subito un effetto di disgregazione cellulare: all'aumentare della frequenza utilizzata sembra aumentare anche l'effetto disgregativo.

A fronte delle prime sessioni sperimentali condotto si è quindi deciso di acquisire anche tutte le informazioni connesse al processo disgregativo generato alle varie frequenze. A tal proposito è stato individuato che, a prescindere dalla frequenza utilizzata per il trattamento, 1 sferoide su 4 va incontro ad un processo di modifica morfologica fino alla completa disgregazione: nella figura 76 è qualitativamente descritta l'entità della disgregazione generata alle diverse frequenze. Inoltre è stato riscontrato che al crescere della frequenza si amplifica l'effetto disgregativo aumentando la distanza tra le singole cellule al termine del trattamento. Per riuscire a dettagliare al meglio questo fenomeno occorrono maggiori sessioni sperimentali, in particolare risulterebbe interessante identificare la soglia di accumulo energetico oltre la quale si instaura il processo disgregativo. Per approfondire questo aspetto occorre inoltre modificare il setup ad immersione in modo da installare un microscopio ottico digitale che permetta di acquisire video o immagini dello sferoide durante il trattamento ad US.

Nella figura 77 sono riportati i dati quantitativi sulla mortalità riscontrata negli sferoidi sottoposti al trattamento ad ultrasuoni. A fronte delle considerazioni fatte nel capitolo 1 in cui è risultato evidente che per prevedere un futuro trattamento clinico efficace anche su tumori collocati in zone profonde sarebbe consigliabile non superare i 2.25 MHz, si può presumere che con 20 trattamenti percutanei si riesca a distruggere la quasi totalità di una massa tumorale usando le frequenze nell'intorno di 1 MHz; che a 2MHz i trattamenti necessari si dimezzano ed infine il trattamento raggiunge la sua massima efficacia con frequenze prossime a 3MHz in grado di uccidere statisticamente più del 50% delle cellule tumorali con un singolo trattamento di 15 minuti.

	1 MHz	2 MHz	3 MHz
CONTROL CELLS			
TREATED CELLS			
	Percutaneous Treatment		Open Surgery

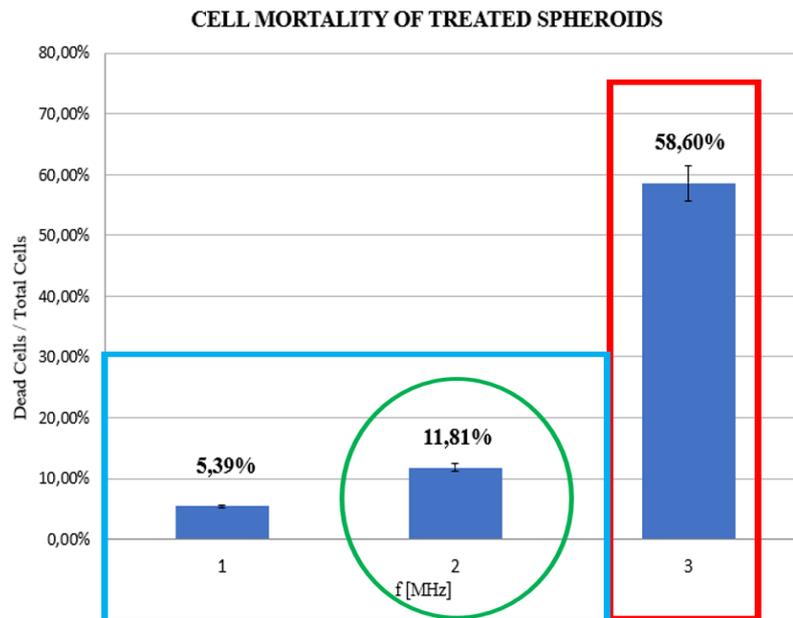


Figura 77: a) Schema con immagini a fluorescenza per associare il tipo di intervento antitumorale perseguibile ed il risultato in termini di mortalità cellulare; b) grafico riassuntivo dei risultati ottenuti con 8 sessioni sperimentali, cerchiato in verde viene evidenziato il trattamento ad US che unisce una buona capacità di raggiungere tumori situati in profondità ed una buona capacità di indurre mortalità cellulare con un trattamento da 15 minuti.

I risultati ottenuti sono frutto di un lavoro di collaborazione e comunicazione interdipartimentale che ha permesso di osservare i protocolli descritti con il massimo rigore al fine di lasciare ai futuri ricercatori un modello sperimentale per proseguire con la ricerca del miglior trattamento antitumorale ad LICUS su cellule tumorali.

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Alla conclusione di questo Dottorato di Ricerca sono state raggiunti molti degli obiettivi prefissi, nonostante le poche risorse a disposizione ed il periodo pandemico provocato dal COVID19. Ogni Milestone che è stata raggiunta mi ha permesso di comprendere maggiormente gli effetti degli US in campo terapeutico ma soprattutto le difficoltà connesse a questo ramo di ricerca sperimentale, si ripercorrono di seguito i passi che hanno caratterizzato il mio percorso ed i risultati raggiunti:

Per mezzo di un'approfondita analisi bibliografica sono stati classificati i vari studi che hanno presentato risultati interessanti in termini di effetti indotti dagli ultrasuoni a bassa intensità su diverse tipologie di tessuti sia sani che tumorali. Questo primo tassello ha permesso di stringere il range di frequenze ed intensità che sarebbero state indagate per il trattamento di cellule tumorali pancreatiche Panc-1, di cui non vi erano all'inizio del mio percorso di dottorato studi dedicati in letteratura.

Successivamente è stato indagato quale fosse il miglior compromesso tra frequenza di sollecitazione con onde ultrasonore e profondità di raggiungimento del tessuto bersaglio al fine di individuare un protocollo di trattamento applicabile senza l'utilizzo di chirurgia open in caso di tumori collocati in zone profonde: l'obiettivo di un progetto di ricerca di questo tipo deve essere quello di aprire la strada verso una tecnologia facilmente applicabile e con la minor invasività possibile per il paziente oncologico.

Sono stati investigate mediante diverse tecniche di imaging microscopiche le proprietà caratteristiche di culture 3D ideali (sferoidi) composti da cellule tumorali Panc-1. Questi dati sono stati poi elaborati per poter sviluppare un modello agli elementi finiti e simulare un breve intervallo di un processo di stimolazione LICU.

Sono state quindi condotte delle simulazioni FEM Dinamiche Non Lineari con comportamenti Iperelastici associati allo sferoide tumorale: i risultati hanno permesso di prendere delle decisioni sulla la configurazione del setup sperimentale e di poter individuare le caratteristiche della sonda ad US ad immersione e dell'Amplificatore RF da commissionare a conto terzi.

E' stato infine progettato, realizzato, e validato in ogni sua parte un setup per la stimolazione ad immersione con protocollo LICU e LIPUS di culture cellulari in MultiWells da 96 pozzetti.

Le sessioni sperimentali condotte hanno permesso di apprezzare, quantificare e soprattutto relazionare gli effetti biofisici e biomeccanici indotti nello sferoide tumorale composto da cellule Panc-1, alle specifiche frequenze delle onde di pressione generate dalla sonda.

Come sviluppo futuro resta da verificare che il protocollo antitumorale messo a punto risulti selettivo su culture cellulari sane di tessuto pancreatico, e successivamente spostare la sperimentazione su tessuto tumorale innestato in cavie di laboratorio: questo protocollo richiede necessariamente un adattamento del setup per poter ospitare la cavia al suo interno.

Infine, a fronte dei risultati che emergeranno da questo ultimo passaggio si potrà procedere alla fase di progettazione del device per uso pre-clinico ed alla sua realizzazione, test, certificazione....

Con questo studio e con la sperimentazione condotta si spera di aver contribuito con un piccolo tassello di esperienza al filone degli US a bassa intensità per uso terapeutico oncologico che negli ultimi anni sta suscitando sempre più interesse.

RINGRAZIAMENTI

In conclusione di questo avvincente percorso, posso asserire che i risultati ottenuti grazie alle metodologie e alle competenze messe in campo sono frutto di un continuo scambio con ricercatori e docenti provenienti da rami disciplinari completamente diversi, che parlano linguaggi molto diversi gli uni agli altri ma senza le quali non avrei potuto raggiungere questi risultati ed addentrarmi così in profondità in argomenti che sembravano così lontani dal mio background all'inizio di questo percorso.

A tal proposito ci tengo a ringraziare:

- Il mio tutor prof. Andrea Corvi che mi ha accolto nel laboratorio di Bioingegneria Industriale, che mi ha saputo spronare anche nei momenti più difficili di questo percorso e che mi ha dato l'opportunità di seguire innumerevoli studenti per il loro percorso di Laurea triennale e Magistrale migliorando così la mia capacità di problem solving e di tutoring.
- Il prof. Lorenzo Capineri responsabile del laboratorio ad US che con disponibilità ha messo a disposizione le sue competenze per la realizzazione dell'amplificatore RF senza il quale non avremmo potuto ottimizzare il set-up definitivo per la sperimentazione.
- La prof. Annarosa Arcangeli responsabile del laboratorio Biologico per le culture cellulari che ha reso disponibili non solo le linee cellulari per la sperimentazione ma anche un team di persone altamente competenti per la valutazione a fluorescenza della vitalità delle cellule post-trattamento
- La Dott.ssa Claudia Duranti con cui ci siamo coordinati per dettagliare i protocolli di incubazione cellulare, trasporto tra i vari laboratori e analisi dei risultati.
- La Dott.ssa Jessica Iorio per aver supportato la dott.ssa Duranti durante il periodo di maternità ed aver assolto egregiamente alle stesse mansioni.
- La prof.ssa Paola Paoli ed il suo team per aver messo a disposizione il Centro di Cristallografia Strutturale per le analisi con Microtomografo.
- Il prof. Leonardo Sacconi ed il suo team per il supporto all'acquisizione a fluorescenza con microscopio confocale degli sferoidi tumorali Panc-1.
- La spin-off Scriba Nanotecnologie per aver messo a disposizione le proprie competenze e strumentazioni per le analisi AFM sugli sferoidi tumorali Panc-1 ed aver così permesso le successive analisi agli elementi finiti.

- Il Dott. Fabio Staderini con il quale sono stati frequenti gli scambi per i numerosi progetti collaterali portati avanti durante questo periodo sulla chirurgia robotica.
- Il prof. Guido Biffi Gentili per i suoi preziosi consigli e per la sua instancabile voglia di innovare nel mondo delle Microonde e non solo.
- L'Ing. Lucrezia Mazzantini per avermi affiancato nel percorso di dottorato ed aver partecipato sempre in modo propositivo alle attività trasversali tra i vari progetti del laboratorio.
- L'Ing. Sara Aquino per i preziosi scambi di opinioni nella quotidianità lavorativa nel BioLab
- La prof. Arianna Menciassi per avermi aperto le porte dell'istituto di Biorobotica del Sant'Anna ed aver condiviso cultura e conoscenza.
- Tutti i Laureandi che ho avuto l'opportunità di seguire e che hanno saputo arricchirmi del loro punto di vista.
- La mia famiglia che è sempre stata al mio fianco in tutti questi anni e che ha sempre saputo stimolare la mia curiosità di scoprire il mondo intorno a me.

L'elenco dovrebbe essere molto più lungo. Nella consapevolezza di aver dimenticato qualcuno, mi scuso con quelli che non sono stati esplicitamente citati e li ringrazio.

PUBBLICAZIONI

Congressi internazionali:

1. F. Frosini, F. Staderini, M. Brancadoro, M. Dimitri, J. Regolini, R. Miniati, M.N. Boushaki, L. Paternò, F. Guerra, A. Coratti, F. Cianchi, A. Corvi, A. Menciacchi, G. Biffi Gentili "A novel microwaves tool for robotic resection of the liver." The 29th Conference of the international Society for Medical Innovation and Technology (SMIT) 2017 Torino, Italy
2. F. Staderini, F. Frosini, M. Brancadoro, M. Dimitri, J. Regolini, R. Miniati, B. Badii, M.N. Boushaki, L. Paternò, A. Vegni, A. Coratti, A. Corvi, G. Biffi Gentili, A. Menciacchi, F. Cianchi "Development of a robotic pre-coagulation device during hepatic surgery." The Clinical Robotic Surgery Association, (CRSA) 2017 Chicago, US
3. T. Bechtel, G. Pochanin, S. Truskavetsky, M. Dimitri, V. Ruban, O. Orlenko, T. Byndych, A. Sherstyuk, K. Viatkin, F. Crawford, P. Falorni, A. Bulletti, L. Capineri "Terrain Analysis in Eastern Ukraine and the Design of a Robotic Platform Carrying GPR Sensors for Landmine Detection" 17th International Conference on Ground Penetrating Radar (GPR) 2018 Rapperswil, Switzerland
4. L. Capineri, M. Dimitri, and G.B. Gentili "Microwave thermal ablation near metallic bronchial prostheses: numerical models and experiments" The 40th PIERS, 2018 in Toyama, Japan
5. G. Pochanin, V. Ruban, T. Ogurtsova, O. Orlenko, I. Pochanina, P. Kholod, Lorenzo Capineri, P. Falorni, A. Bulletti, M. Dimitri, L. Bossi, T. Bechtel, F. Crawford "Application of the Industry 4.0 Paradigm to the Design of a UWB Radiolocation System for Humanitarian Demining" International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals. Odessa, Ukraine, September 4 – 7, 2018
6. L. Capineri, P. Falorni, A. Bartolini, L. Bossi, A. Bulletti, M. Dimitri, G. Pochanin, V. Ruban, T. Ogurtsova, O. Orlenko, I. Pochanina, P. Kholod, F. Crawford, T. Bechtel, G. Sallai, A. Kuske, J. Sinton, S. Truskavetsky, & T. Byndych "Machine vision for Obstacle Avoidance, Tripwire detection, and subsurface Radar Correction on a Robotic Vehicle for the Detection and Discrimination of Landmines" PIERS Progress in Electromagnetics Research Symposium, Rome, Italy (2019)
7. M. Dimitri, F. Staderini, M. Brancadoro, F. Frosini, A. Coratti, A. Corvi, F. Cianchi, G. Biffi Gentili and L. Capineri "Development of surgical system of thermal ablation and microwave coagulation" PIERS Progress in Electromagnetics Research Symposium, Rome, Italy (2019)
8. M. Dimitri, F. Staderini, L. Mazzantini, S. Aquino, A. Corvi, G. Biffi Gentili "Comparison of ex-vivo perfused and non-perfused porcine liver ablations using uncooled microwave applicators" BIODEVICE - 13th International Conference on Biomedical Electronics and Devices, Valletta, Malta (2020)

Riviste internazionali con referee:

1. M. Dimitri, F. Staderini, M. Brancadoro, F. Frosini, A. Coratti, L. Capineri, A. Corvi, F. Cianchi and G. Biffi Gentili “A new microwave applicator for laparoscopic and robotic liver resection” International Journal of Hypertermia (DOI:10.1080/02656736.2018.1534004)
2. G. Pochanin, V. Ruban, T. Ogurtsova, O. Orlenko, I. Pochanina, P. Kholod, Lorenzo Capineri, P. Falorni, A. Bulletti, M. Dimitri, L. Bossi, T. Bechtel, F. Crawford” Application of the Industry 4.0 Paradigm to the Design of a UWB Radiolocation System for Humanitarian Demining” Fast Times; Volume 24, 2 2019 pag.113-120
3. L. Mazzantini, M. Dimitri, F. Staderini, F. Cianchi, A. Corvi “Design and realization of a normothermic perfusion system for laboratory tests on pig liver” International Journal Of Artificial Organs” (DOI: 10.1177/0391398819865744)
4. Capineri L.; Bechtel, T; Pochanin G.; Borgioli G.; Bulletti A.; Dimitri M.; Falorni P.; Simic N.; Varyanitz-Roschupkin L.; Ruban V.; Pochanin O.; Ogurstova T.” Holographic and impulse subsurface radar for landmine and IED detection” (ISBN:978-94-024-1728-9 <http://hdl.handle.net/2158/1184175>)
5. Margherita Brancadoro, Mattia Dimitri†, Mohamed Nassim Boushaki , Fabio Staderini, Edoardo Sinibaldi, Lorenzo Capineri, Fabio Cianchi, Guido Biffi Gentili and Arianna Menciassi “A Novel Microwave Tool for the Liver Robotic Resection in Minimally Invasive Surgery” (DOI: <https://doi.org/10.1080/13645706.2020.1749083>)

BREVETTI:

1. “Dispositivo per la perfusione extracorporea di un organo” – (<http://hdl.handle.net/2158/1181424>)

APPENDICE 1

Programma Matlab sviluppato per il postprocessing delle immagini acquisite con il miscoscopio confocale a fluorescenza.

Stima_area_cellulare.m

```
clear all;
close all;
%Regione esterna su immagine Stack0007
%Inserire il percorso del file
rgb_image=imread('C:\Users\Documents\MATLAB\Stack0007.jpg');
%Visualizzazione dell'immagine originale
figure; imshow(rgb_image); title('Stack0007');
%Conversione immagine da rgb a hsv
hsv_image=rgb2hsv(rgb_image);
H=hsv_image(:,:,1);
S=hsv_image(:,:,2);
V=hsv_image(:,:,3);

%Individuazione della soglia dell'immagine in livelli di grigio
T= graythresh(V);
%Conversione binaria dell'immagine
g = im2bw(V,T);
figure; imshow(g);title('Stack0007');
%Calcolo dell'area cellulare dell'immagine g
area_image=regionprops(g, 'area');
%Conversione dell'area da struct a matrice
area_image_cell=struct2cell(area_image);
area_image_array=cell2mat(area_image_cell);

%Calcolo dimensione matrice area_image_array
[N,M]=size(area_image_array);
area_vector=zeros;
%Seleziona le aree comprese tra [95-130) pixel
for i=1:M
if (area_image_array(i))>=95 && (area_image_array(i))<130
    area_vector(i)=area_image_array(i);
end
end
%area media cellula esterna
%elimino i valori uguali a zero presenti nel vettore area_vector
```

```

area_vector(area_vector==0)=[];
    area_media=round(mean(area_vector));
    tot_area=sum(area_vector);
%Densità su area esterna
%Individuo posizione ed area da selezionare per ritagliare l'immagine
rect_ext=[690 550 79 79];
%Crop immagine di area e posizione selezionato tramite rect
crop_image_ext=imcrop(g,rect_ext);
%Conversione immagine da logical a double
crop_imaged_ext=im2double(crop_image_ext);
figure;imshow(crop_imaged_ext);title('Crop Stack0007');
%Calcolo dimensione crop_imaged_ext
[u,p]=size(crop_imaged_ext);
%Calcolo delle aree cellulari dell'immagine crop_imaged_ext
area_image_ext=regionprops(crop_image_ext, 'area');
%Conversione da struct a matrice
area_image_cell_ext=struct2cell(area_image_ext);
area_image_array_ext=cell2mat(area_image_cell_ext);

cropped_ext=zeros;
%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_ext con numero di pixel >1
for z=1:length(area_image_array_ext)
if (area_image_array_ext(z))>1
    cropped_ext(z)=(area_image_array_ext(z));
end
end
cropped_ext(cropped_ext==0)=[]; %elimino gli zeri dal vettore
%Calcola la somma delle aree con un numero di pixel>1
area_cropped_ext=sum(cropped_ext);
%approssimo a numero intero più vicino
cellule_ext=round(area_cropped_ext/area_media);
%Calcolo della densità cellulare sull'area u*p
densita_ext=cellule_ext/(u*p); %cellule su pixel
%Conversione pixel in micrometri
densita_micro_ext=densita_ext/(1.265)^(2);
%L'unità di misura è porzione di cellule su micrometri quadrati
%Regione esterna su immagine Stack0005 per confronto
%Seguire procedimento e comandi utilizzati per la Regione esterna
%Inserire il percorso del file
rgb_image_conf=imread('C:\Users\Documents\MATLAB\stack0005.jpg');
figure; imshow(rgb_image_conf); title('Stack0005');

```

```

hsv_image_conf=rgb2hsv(rgb_image_conf);
H_conf=hsv_image_conf(:,:,1);
S_conf=hsv_image_conf(:,:,2);
V_conf=hsv_image_conf(:,:,3);

T_conf= graythresh(V_conf);
g_conf = im2bw(V_conf,T_conf);
figure; imshow(g_conf); title('Stack0005');
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_conf=[550 550 79 79];
crop_image_conf=imcrop(g_conf,rect_conf);
crop_imaged_conf=im2double(crop_image_conf);
figure;imshow(crop_imaged_conf);
[k,j]=size(crop_imaged_conf);title('Crop Stack0005');
area_image_conf=regionprops(crop_image_conf, 'area');
area_image_cell_conf=struct2cell(area_image_conf);
area_image_array_conf=cell2mat(area_image_cell_conf);

cropped_conf=zeros;
%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_conf con numero di pixel >1
for w=1:length(area_image_array_conf)
if (area_image_array_conf(w))>1
    cropped_conf(w)=(area_image_array_conf(w));
end
end
cropped_conf(cropped_conf==0)=[];
area_cropped_conf=sum(cropped_conf);
cellule_conf=round(area_cropped_conf/area_media);
densita_conf=cellule_conf/(k*j); %cellule su pixel
%Conversione da pixel a micrometri
densita_micro_conf=densita_conf/(1.265)^(2); %cellule su micrometri

%Calcolo aree cellule dell'immagine g_conf
image_conf=regionprops(g_conf, 'area');
image_cell_conf=struct2cell(image_conf);
image_array_conf=cell2mat(image_cell_conf);

[L,N]=size(image_array_conf);
bordo_conf=zeros;

```

```

%Considero aree image_array_conf comprese tra (900-2290)
for i=1:N
if (image_array_conf(i))>900 && (image_array_conf(i))<2290
    bordo_conf(i)=image_array_conf(i);
end
end

%Nucleo su immagine Stack0007_5
%Seguire procedimento e comandi utilizzati per la Regione esterna
%Inserire il percorso del file
rgb_nucleo=imread('C:\Users\Documents\MATLAB\Stack0007_5.jpg');
%Visualizzazione dell'immagine originale
figure; imshow(rgb_nucleo); title('Stack0007_5');
%Conversione immagine da rgb a hsv
hsv_image_nucleo=rgb2hsv(rgb_nucleo);
H_nucleo=hsv_image_nucleo(:,:,1);
S_nucleo=hsv_image_nucleo(:,:,2);
V_nucleo=hsv_image_nucleo(:,:,3);

T_nucleo= graythresh(V_nucleo);
%Conversione binaria dell'immagine
g_nucleo = im2bw(V_nucleo,T_nucleo);
figure; imshow(g_nucleo);title('Stack0007_5');
%Individuo posizione ed area da selezionare per ritagliare l'immagine
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_nucleo=[520 640 79 79];
%Crop immagine di area e posizione selezionato tramite rect
crop_image_nucleo=imcrop(g_nucleo,rect_nucleo);
%Conversione immagine da logical a double
crop_imaged_nucleo=im2double(crop_image_nucleo);
figure;imshow(crop_imaged_nucleo);title('Crop0 Stack0007_5');
%Calcolo dimensione crop_imaged_nucleo
[u,p]=size(crop_imaged_nucleo);
%Calcolo delle aree cellulari dell'immagine crop_imaged_nucleo
area_image_nucleo=regionprops(crop_image_nucleo, 'area');
%Conversione da struct a matrice
area_image_cell_nucleo=struct2cell(area_image_nucleo);
area_image_array_nucleo=cell2mat(area_image_cell_nucleo);

cropped_nucleo=zeros;

```

```

%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_nucleo con numero di pixel >1
for t=1:length(area_image_array_nucleo)
if (area_image_array_nucleo(t))>0.5
    cropped_nucleo(t)=(area_image_array_nucleo(t));
end
end
cropped_nucleo(cropped_nucleo==0)=[]; %elimino gli zeri dal vettore
area_cropped_nucleo=sum(cropped_nucleo);
%approssimo a numero intero più vicino
cellule_nucleo=round(area_cropped_nucleo/area_media);
%Calcolo della densità cellulare sull'area u*p
%cellule su pixel
%Conversione pixel in micrometri
densita_nucleo=cellule_nucleo/(u*p);
densita_micro_nucleo=densita_nucleo/(1.265)^(2); %cellule su micrometri

Densita_media_esterna
%% Prima di avviare densita_media_esterna mandare stima_area_cellulare.m
close all;
figure; imshow(g); title('Stack0007')
%Densità su anello esterno
%Individuo posizione ed area da selezionare per ritagliare l'immagine
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_ext=[690 550 79 79];
%Crop immagine di area e posizione selezionato tramite rect
crop_image_ext=imcrop(g,rect_ext);
%Conversione immagine da logical a double
crop_imaged_ext=im2double(crop_image_ext);
figure;imshow(crop_imaged_ext);title('Crop0 Stack0007');
%Calcolo dimensione crop_imaged_ext
[u,p]=size(crop_imaged_ext);
%Calcolo delle aree cellulari dell'immagine crop_imaged_ext
area_image_ext=regionprops(crop_image_ext, 'area');

%Conversione da struct a matrice
area_image_cell_ext=struct2cell(area_image_ext);
area_image_array_ext=cell2mat(area_image_cell_ext);

cropped_ext=zeros;
%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_ext con numero di pixel >1

```

```

for z=1:length(area_image_array_ext)
if (area_image_array_ext(z))>1
    cropped_ext(z)=(area_image_array_ext(z));
end
end
cropped_ext(cropped_ext==0)=[]; %elimino gli zeri dal vettore
%Calcola la somma delle aree maggiori di 1 pixel all'interno dell'immagine crop_imaged_ext
area_cropped_ext=sum(cropped_ext);
%approssimo a numero intero più vicino
cellule_ext=round(area_cropped_ext/area_media);
%Calcolo della densità cellulare sull'area u*p
densita_ext=cellule_ext/(u*p); %cellule su pixel
%Conversione pixel in micrometri
densita_micro_ext=densita_ext/(1.265)^(2); %cellule su micrometri

%% Selezione della seconda area
%Individuo posizione ed area da selezionare per ritagliare l'immagine
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_ext1=[400 340 79 79];
%Crop immagine di area e posizione selezionato tramite rect
crop_image_ext1=imcrop(g,rect_ext1);
%Conversione immagine da logical a double
crop_imaged_ext1=im2double(crop_image_ext1);
figure;imshow(crop_imaged_ext1);title('Crop1 Stack0007');
%Calcolo dimensione crop_imaged_ext1
%Calcolo delle aree cellulari dell'immagine crop_imaged_ext1
area_image_ext1=regionprops(crop_image_ext1, 'area');
%Conversione da struct a matrice
area_image_cell_ext1=struct2cell(area_image_ext1);
area_image_array_ext1=cell2mat(area_image_cell_ext1);

cropped_ext1=zeros;

%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_ext1 con numero di pixel >1
for z=1:length(area_image_array_ext1)
if (area_image_array_ext1(z))>1
    cropped_ext1(z)=(area_image_array_ext1(z));
end
end
cropped_ext1(cropped_ext1==0)=[]; %elimino gli zeri dal vettore
%Calcola la somma delle aree maggiori di 1 pixel all'interno dell'immagine

```

```

%crop_imaged_ext1
area_cropped_ext1=sum(cropped_ext1);
%approssimo a numero intero più vicino
cellule_ext1=round(area_cropped_ext1/area_media);
%Calcolo della densità cellulare sull'area u*p
densita_ext1=cellule_ext1/(u*p); %cellule su pixel
%Conversione pixel in micrometri
densita_micro_ext1=densita_ext1/(1.265)^(2); %cellule su micrometri
%%
%%3
%Individuo posizione ed area da selezionare per ritagliare l'immagine
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_ext2=[540 360 79 79];
%Crop immagine di area e posizione selezionato tramite rect
crop_image_ext2=imcrop(g,rect_ext2);
%Conversione immagine da logical a double
crop_imaged_ext2=im2double(crop_image_ext2);
figure;imshow(crop_imaged_ext2);title('Crop2 Stack0007');
%Calcolo dimensione crop_imaged_ext2
%Calcolo delle aree cellulari dell'immagine crop_imaged_ext2
area_image_ext2=regionprops(crop_image_ext2, 'area');
%Conversione da struct a matrice
area_image_cell_ext2=struct2cell(area_image_ext2);
area_image_array_ext2=cell2mat(area_image_cell_ext2);

cropped_ext2=zeros;
%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_ext2 con numero di pixel >1
for z=1:length(area_image_array_ext2)
if (area_image_array_ext2(z))>1
    cropped_ext2(z)=(area_image_array_ext2(z));
end
end

cropped_ext2(cropped_ext2==0)=[]; %elimino gli zeri dal vettore
%Calcola la somma delle aree maggiori di 1 pixel all'interno dell'immagine
%crop_imaged_ext2
area_cropped_ext2=sum(cropped_ext2);
%approssimo a numero intero più vicino

cellule_ext2=round(area_cropped_ext2/area_media);

```

```

%Calcolo della densità cellulare sull'area u*p
densita_ext2=cellule_ext2/(u*p); %cellule su pixel
%Conversione pixel in micrometri
densita_micro_ext2=densita_ext2/(1.265)^(2); %cellule su micrometri
%%
%%4
%Individuo posizione ed area da selezionare per ritagliare l'immagine
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_ext3=[660 650 79 79];
%Crop immagine di area e posizione selezionato tramite rect
crop_image_ext3=imcrop(g,rect_ext3);
%Conversione immagine da logical a double
crop_imaged_ext3=im2double(crop_image_ext3);
figure;imshow(crop_imaged_ext3);title('Crop3 Stack0007');
%Calcolo dimensione crop_imaged_ext3
%Calcolo delle aree cellulari dell'immagine crop_imaged_ext3
area_image_ext3=regionprops(crop_image_ext3, 'area');
%Conversione da struct a matrice
area_image_cell_ext3=struct2cell(area_image_ext3);
area_image_array_ext3=cell2mat(area_image_cell_ext3);

cropped_ext3=zeros;
%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_ext3 con numero di pixel >1
for z=1:length(area_image_array_ext3)
if (area_image_array_ext3(z))>1
    cropped_ext3(z)=(area_image_array_ext3(z));
end
end
cropped_ext3(cropped_ext3==0)=[]; %elimino gli zeri dal vettore
%Calcola la somma delle aree maggiori di 1 pixel all'interno dell'immagine
%crop_imaged_ext3
area_cropped_ext3=sum(cropped_ext3);

%Approssimo a numero intero più vicino
cellule_ext3=round(area_cropped_ext3/area_media);
%Calcolo della densità cellulare sull'area u*p
densita_ext3=cellule_ext3/(u*p); %cellule su pixel
%Conversione pixel in micrometri
densita_micro_ext3=densita_ext3/(1.265)^(2); %cellule su micrometri

```

```

%Calcolo densità media totale
densita_totale_esterna=(densita_micro_ext+densita_micro_ext1+densita_micro_ext2+densita_micro_ext3)/4;

Densita_media_esterna_confronto
%% Prima di avviare densita_media_esterna_confronto mandare stima_area_cellulare.m
close all;
figure; imshow(g_conf); title('Stack0005')
%Densità su anello esterno per confronto
%Individuo posizione ed area da selezionare per ritagliare l'immagine
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_conf=[550 650 79 79];
crop_image_conf=imcrop(g_conf,rect_conf);
crop_imaged_conf=im2double(crop_image_conf);
figure;imshow(crop_imaged_conf);
[k,j]=size(crop_imaged_conf);title('Crop0 Stack0005');
area_image_conf=regionprops(crop_image_conf, 'area');
area_image_cell_conf=struct2cell(area_image_conf);
area_image_array_conf=cell2mat(area_image_cell_conf);

cropped_conf=zeros;
%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_conf con numero di pixel >1
for w=1:length(area_image_array_conf)
if (area_image_array_conf(w))>1
    cropped_conf(w)=(area_image_array_conf(w));
end
end
cropped_conf(cropped_conf==0)=[];
area_cropped_conf=sum(cropped_conf);
cellule_conf=round(area_cropped_conf/area_media);
densita_conf=cellule_conf/(k*j); %cellule su pixel
%Conversione da pixel a micrometri
densita_micro_conf=densita_conf/(1.265)^(2); %cellule su micrometri
%%
%%Selezione seconda area
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_conf1=[540 600 79 79];
crop_image_conf1=imcrop(g_conf,rect_conf1);
crop_imaged_conf1=im2double(crop_image_conf1);
figure;imshow(crop_imaged_conf1);title('Crop1 Stack0005');
area_image_conf1=regionprops(crop_image_conf1, 'area');
area_image_cell_conf1=struct2cell(area_image_conf1);
area_image_array_conf1=cell2mat(area_image_cell_conf1);

```

```

cropped_conf1=zeros;
%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_conf1 con numero di pixel >1
for w=1:length(area_image_array_conf1)
if (area_image_array_conf1(w))>1
    cropped_conf1(w)=(area_image_array_conf1(w));
end
end
cropped_conf1(cropped_conf1==0)=[];
area_cropped_conf1=sum(cropped_conf1);
cellule_conf1=round(area_cropped_conf1/area_media);
densita_conf1=cellule_conf1/(k*j); %cellule su pixel
%Conversione da pixel a micrometri
densita_micro_conf1=densita_conf1/(1.265)^(2); %cellule su micrometri
%%
%%Terza area
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_conf2=[530 670 79 79];
crop_image_conf2=imcrop(g_conf,rect_conf2);
crop_imaged_conf2=im2double(crop_image_conf2);
figure;imshow(crop_imaged_conf2);
[k,j]=size(crop_imaged_conf2);title('Crop2 Stack0005');
area_image_conf2=regionprops(crop_image_conf2, 'area');
area_image_cell_conf2=struct2cell(area_image_conf2);
area_image_array_conf2=cell2mat(area_image_cell_conf2);

cropped_conf2=zeros;

%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_conf2 con numero di pixel >1
for w=1:length(area_image_array_conf2)
if (area_image_array_conf2(w))>1
    cropped_conf2(w)=(area_image_array_conf2(w));
end
end
cropped_conf2(cropped_conf2==0)=[];
area_cropped_conf2=sum(cropped_conf2);
cellule_conf2=round(area_cropped_conf2/area_media);
densita_conf2=cellule_conf2/(k*j); %cellule su pixel

```

```

%Conversione da pixel a micrometri
densita_micro_conf2=densita_conf2/(1.265)^(2); %cellule su micrometri
%%
%%Quarta area
rect_conf3=[590 520 79 79]; %(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
crop_image_conf3=imcrop(g_conf,rect_conf3);
crop_imaged_conf3=im2double(crop_image_conf3);
figure;imshow(crop_imaged_conf3);
[k,j]=size(crop_imaged_conf3);title('Crop3 Stack0005');
area_image_conf3=regionprops(crop_image_conf3, 'area');
area_image_cell_conf3=struct2cell(area_image_conf3);
area_image_array_conf3=cell2mat(area_image_cell_conf3);

cropped_conf3=zeros;
%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_conf3 con numero di pixel >1
for w=1:length(area_image_array_conf3)
if (area_image_array_conf3(w))>1
    cropped_conf3(w)=(area_image_array_conf3(w));
end
end
cropped_conf3(cropped_conf3==0)=[];
area_cropped_conf3=sum(cropped_conf3);
cellule_conf3=round(area_cropped_conf3/area_media);
densita_conf3=cellule_conf3/(k*j); %cellule su pixel
%Conversione da pixel a micrometri
densita_micro_conf3=densita_conf3/(1.265)^(2); %cellule su micrometri

densita_totale_confronto=(densita_micro_conf+densita_micro_conf1+densita_micro_conf2+densita_micro_conf3)/4;

Densita_media_nucleo
%% Prima di avviare densita_media_esterna_confronto mandare stima_area_cellulare.m
close all;
figure; imshow(g_nucleo); title('Stack0007_5')
%Densità su nucleo
%Individuo posizione ed area da selezionare per ritagliare l'immagine
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_nucleo=[520 640 79 79];
%Crop immagine di area e posizione selezionato tramite rect
crop_image_nucleo=imcrop(g_nucleo,rect_nucleo);
%Conversione immagine da logical a double
crop_imaged_nucleo=im2double(crop_image_nucleo);

```

```

figure;imshow(crop_imaged_nucleo);title('Crop0 Stack0007_5');
%Calcolo dimensione crop_imaged_nucleo
[u,p]=size(crop_imaged_nucleo);
%Calcolo delle aree cellulari dell'immagine crop_imaged_nucleo
area_image_nucleo=regionprops(crop_image_nucleo, 'area');
%Conversione da struct a matrice
area_image_cell_nucleo=struct2cell(area_image_nucleo);
area_image_array_nucleo=cell2mat(area_image_cell_nucleo);

cropped_nucleo=zeros;
%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_nucleo con numero di pixel >1
for t=1:length(area_image_array_nucleo)
if (area_image_array_nucleo(t))>0.5
    cropped_nucleo(t)=(area_image_array_nucleo(t));
end
end
cropped_nucleo(cropped_nucleo==0)=[]; %elimino gli zeri dal vettore
area_cropped_nucleo=sum(cropped_nucleo);
cellule_nucleo=round(area_cropped_nucleo/area_media); %approssimo a numero intero più vicino
%Calcolo della densità cellulare sull'area u*p
densita_nucleo=cellule_nucleo/(u*p); %cellule su pixel
%Conversione pixel in micrometri
densita_micro_nucleo=densita_nucleo/(1.265)^(2); %cellule su micrometri

%% Selezione della seconda area
%Individuo posizione ed area da selezionare per ritagliare l'immagine
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_nucleo1=[540 630 79 79];
%Crop immagine di area e posizione selezionato tramite rect
crop_image_nucleo1=imcrop(g_nucleo,rect_nucleo1);
%Conversione immagine da logical a double
crop_imaged_nucleo1=im2double(crop_image_nucleo1);
figure;imshow(crop_imaged_nucleo1);title('Crop1 Stack0007_5');
%Calcolo delle aree cellulari dell'immagine crop_imaged_nucleo1
area_image_nucleo1=regionprops(crop_image_nucleo1, 'area');
%Conversione da struct a matrice
area_image_cell_nucleo1=struct2cell(area_image_nucleo1);
area_image_array_nucleo1=cell2mat(area_image_cell_nucleo1);

```

```

cropped_nucleo1=zeros;
%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_nucleo1 con numero di pixel >1
for t=1:length(area_image_array_nucleo1)
if (area_image_array_nucleo1(t))>1
    cropped_nucleo1(t)=(area_image_array_nucleo1(t));
end
end
cropped_nucleo1(cropped_nucleo1==0)=[]; %elimino gli zeri dal vettore
area_cropped_nucleo1=sum(cropped_nucleo1);
%approssimo a numero intero più vicino
cellule_nucleo1=round(area_cropped_nucleo1/area_media);
%Calcolo della densità cellulare sull'area u*p
%cellule su pixel
densita_nucleo1=cellule_nucleo1/(u*p);
%Conversione pixel in micrometri
densita_micro_nucleo1=densita_nucleo1/(1.265)^(2); %cellule su micrometri
%%
%%3
%Individuo posizione ed area da selezionare per ritagliare l'immagine
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_nucleo2=[540 510 79 79];
%Crop immagine di area e posizione selezionato tramite rect
crop_image_nucleo2=imcrop(g_nucleo,rect_nucleo2);
%Conversione immagine da logical a double
crop_imaged_nucleo2=im2double(crop_image_nucleo2);
figure;imshow(crop_imaged_nucleo2);title('Crop2 Stack0007_5');
%Calcolo delle aree cellulari dell'immagine crop_imaged_nucleo2
area_image_nucleo2=regionprops(crop_image_nucleo2, 'area');
%Conversione da struct a matrice
area_image_cell_nucleo2=struct2cell(area_image_nucleo2);
area_image_array_nucleo2=cell2mat(area_image_cell_nucleo2);

cropped_nucleo2=zeros;
%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_nucleo2 con numero di pixel >1
for t=1:length(area_image_array_nucleo2)
if (area_image_array_nucleo2(t))>1
    cropped_nucleo2(t)=(area_image_array_nucleo2(t));
end
end
cropped_nucleo2(cropped_nucleo2==0)=[]; %elimino gli zeri dal vettore

```

```

%Calcola la somma delle aree maggiori di 1 pixel all'interno dell'immagine
%crop_imaged_nucleo2
area_cropped_nucleo2=sum(cropped_nucleo2);
%approssimo a numero intero più vicino
cellule_nucleo2=round(area_cropped_nucleo2/area_media);
%Calcolo della densità cellulare sull'area u*p
densita_nucleo2=cellule_nucleo2/(u*p); %cellule su pixel
%Conversione pixel in micrometri
densita_micro_nucleo2=densita_nucleo2/(1.265)^(2); %cellule su micrometri
%%
%%4
%Individuo posizione ed area da selezionare per ritagliare l'immagine
%(considerata un'area di 10000 micrometri quadrati)
rect_nucleo3=[420 590 79 79];
%Crop immagine di area e posizione selezionato tramite rect
crop_image_nucleo3=imcrop(g_nucleo,rect_nucleo3);
%Conversione immagine da logical a double
crop_imaged_nucleo3=im2double(crop_image_nucleo3);
figure;imshow(crop_imaged_nucleo3);title('Crop3 Stack0007_5');
%Calcolo delle aree cellulari dell'immagine crop_imaged_nucleo3
area_image_nucleo3=regionprops(crop_image_nucleo3, 'area');
%Conversione da struct a matrice
area_image_cell_nucleo3=struct2cell(area_image_nucleo3);
area_image_array_nucleo3=cell2mat(area_image_cell_nucleo3);

cropped_nucleo3=zeros;
%Seleziona aree dell'immagine crop_imaged_nucleo3 con numero di pixel >1
for t=1:length(area_image_array_nucleo3)
if (area_image_array_nucleo3(t))>1
    cropped_nucleo3(t)=(area_image_array_nucleo3(t));
end
end
cropped_nucleo3(cropped_nucleo3==0)=[]; %elimino gli zeri dal vettore
%Calcola la somma delle aree maggiori di 1 pixel all'interno dell'immagine
%crop_imaged_nucleo3
area_cropped_nucleo3=sum(cropped_nucleo3);
cellule_nucleo3=round(area_cropped_nucleo3/area_media); %approssimo a numero intero più vicino
%Calcolo della densità cellulare sull'area u*p
densita_nucleo3=cellule_nucleo3/(u*p); %cellule su pixel

```

%Conversione pixel in micrometri

$densita_micro_nucleo3 = densita_nucleo3 / (1.265)^2$; *%cellule su micrometri*

%Calcolo densità media totale

$densita_totale_nucleo = (densita_micro_nucleo + densita_micro_nucleo1 + densita_micro_nucleo2 + densita_micro_nucleo3) / 4$;

BIBLIOGRAFIA

- [1] Y. Furusawa *et al.*, “DNA Double-Strand Breaks Induced by Cavitation Mechanical Effects of Ultrasound in Cancer Cell Lines,” *PLoS One*, vol. 7, no. 1, p. e29012, 2012.
- [2] S. A. Quadri *et al.*, “High-intensity focused ultrasound: past, present, and future in neurosurgery,” *Neurosurg. Focus*, vol. 44, no. February, pp. 1–9, 2018.
- [3] H. Korkusuz, N. Fehre, M. Sennert, C. Happel, and F. Grünwald, “Volume reduction of benign thyroid nodules 3 months after a single treatment with high-intensity focused ultrasound (HIFU),” *J. Ther. Ultrasound*, vol. 3, no. 1, pp. 1–10, 2015.
- [4] B. H.-H. Lang and A. L. H. Wu, “High intensity focused ultrasound (HIFU) ablation of benign thyroid nodules – a systematic review,” *J. Ther. Ultrasound*, vol. 5, no. 1, p. 11, 2017.
- [5] S. Y. Yeo, A. J. A. Moreno, B. Van Rietbergen, N. D. Hoeve, and P. J. Van Diest, “Effects of magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound ablation on bone mechanical properties and modeling,” *J. Ther. Ultrasound*, pp. 1–10, 2015.
- [6] N. T. Sanghvi *et al.*, “Clinical validation of real-time tissue change monitoring during prostate tissue ablation with high intensity focused ultrasound,” *J. Ther. Ultrasound*, pp. 1–12, 2017.
- [7] L. B. Feril, K. Tachibana, K. Ogawa, K. Yamaguchi, I. G. Solano, and Y. Irie, “Therapeutic potential of low-intensity ultrasound (part 1): Thermal and sonomechanical effects,” *J. Med. Ultrason.*, vol. 35, no. 4, pp. 153–160, 2008.
- [8] J. Tang, C. Guha, and W. Tomé, “Biological Effects Induced by Non-thermal Ultrasound and Implications for Cancer Therapy: A Review of the Current Literature,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 14, no. 2, pp. 221–235, 2015.
- [9] I. Hrazdira, J. Škorpíková, and M. Dolníková, “Ultrasonically induced alterations of cultured tumour cells,” *Eur. J. Ultrasound*, vol. 8, no. 1, pp. 43–49, 1998.
- [10] A.-E. A. M. Etienne Mfoumou, Sivakumar Narayanswamy, Ion Stiharu, “Low power ultrasound inhibits cell proliferation and invasion of human cancer cells in vitro,” *Clin. cancer Investig. J.*, vol. 1–2, pp. 51–56, 2012.
- [11] L. B. Feril *et al.*, “Therapeutic potential of low-intensity ultrasound (part 2): Biomolecular effects, sonotransfection, and sonopermeabilization,” *J. Med. Ultrason.*, vol. 35, no. 4, pp. 161–167, 2008.
- [12] F. Lejbkowitz and S. Salzberg, “Distinct sensitivity of normal and malignant cells to ultrasound in vitro,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 105, no. SUPPL. 6, pp. 1575–1578, 1997.
- [13] P. Costantini, E. Jacotot, D. Decaudin, and G. Kroemer, “Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 92, no. 13, pp. 1042–1053, 2000.
- [14] J. F. R. KERR, A. H. WYLLIE, and A. R. CURRIE, “Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics,” *J. Intern. Med.*, vol. 258, no. 6, pp. 479–517, 1972.

- [15] M. Ivone, C. Pappalettere, A. Watanabe, and K. Tachibana, "Study of cellular response induced by low intensity ultrasound frequency sweep pattern on myelomonocytic lymphoma U937 cells," *J. Ultrasound*, vol. 19, no. 3, pp. 167–174, 2016.
- [16] P. Wang, Y. Li, X. Wang, L. Guo, X. Su, and Q. Liu, "Membrane damage effect of continuous wave ultrasound on K562 human leukemia cells," *J. Ultrasound Med.*, vol. 31, no. 12, pp. 1977–86, 2012.
- [17] T. M. Louw, G. Budhiraja, H. J. Viljoen, A. Subramanian, "Mechanotransduction of Ultrasound is Frequency Dependent Below the Cavitation Threshold," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 39, no. 7, pp. 1303–1319, 2013.
- [18] B. Krasovitski, V. Frenkel, S. Shoham, and E. Kimmel, "Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 8, pp. 3258–3263, 2011.
- [19] L. B. Feril Jr. and T. Kondo, "Biological effects of low intensity ultrasound: the mechanism involved, and its implications on therapy and on biosafety of ultrasound," *J Radiat Res*, vol. 45, no. 4, pp. 479–489, 2004.
- [20] P. N. Alberto Puliafito, Lars Hufnagela, S. Streichanb, A. Sigalc, D. K. Fygensond, and and B. I. Shraiman, "Re: Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition," *Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 4, pp. 739–744, 2012.
- [21] M. Plodinec *et al.*, "The nanomechanical signature of breast cancer," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 11, pp. 757–765, 2012.
- [22] W. Xu, R. Mezencev, B. Kim, L. Wang, J. McDonald, and T. Sulchek, "Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, 2012.
- [23] M. Ivone, C. Pappalettere, and K. Tachibana, "Differences in the Behavior of Attached and Floating Cells Subjected to Low Intensity Ultrasound," *Int. J. Pharma Med. Biol. Sci.*, vol. 6, no. 1, pp. 7–10, 2017.
- [24] Ware MJ, Colbert K, Keshishian V, Ho J, Corr SJ, Curley SA, et al. Generation of Homogenous Three-Dimensional Pancreatic Cancer Cell Spheroids Using an Improved Hanging Drop Technique. *Tissue Eng Part C Methods* [Internet]. 2016;22(4):312–21.
- [25] G. Hamilton, "Multicellular spheroids as an in vitro tumor model," *Cancer Lett.*, vol. 131, no. 1, pp. 29–34, 1998.
- [26] L. B. Weiswald, D. Bellet, and V. Dangles-Marie, "Spherical Cancer Models in Tumor Biology," *Neoplasia (United States)*, vol. 17, no. 1, pp. 1–15, 2015.
- [27] A. Desmaison, C. Frongia, K. Grenier, B. Ducommun, and V. Lobjois, "Mechanical stress impairs mitosis progression in multi-cellular tumor spheroids," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, pp. 4–13, 2013
- [28] P. N. T. Wells and H.-D. Liang, "Medical ultrasound: imaging of soft tissue strain and elasticity," *J. R. Soc. Interface*, no. June, pp. 1521–1549, 2011.
- [29] G. Ferraioli *et al.*, "Reproducibility of real-time shear wave elastography in the evaluation of liver elasticity," *Eur. J. Radiol.*, vol. 81, no. 11, pp. 3102–3106, 2012.
- [30] A. P. Sarvazyan, M. W. Urban, and J. F. Greenleaf, "Acoustic waves in medical imaging and diagnostics," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 39, no. 7, pp. 1133–1146, 2013.
- [31] A. Salgarella, A. Cafarelli, L. Capineri *et al.*, "Optimal ultrasound exposure condition for maximizing C2C12 muscle cell proliferation and differentiation", *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 43, no. 7, pp. 1452-1465, 2017.
- [32] Sicari B.M. et Al. 2015, "Extracellular Matrix as a Bioscaffold for Tissue Engineering", *Tissue Engineering*, Elsevier, pp. 149-175
- [33] Giuliak F. Cohen D.M. Estes B.T. Jimble J.M. Liedtke W. Chen C.S., 2009, "Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix", *Cell Stem Cells*, vol. 5, no. 1, pp. 17-26
- [34] Ingber D.E., 2004, "The mechanochemical basis of cell and tissue regulation", *Mechanics & chemistry of biosystems: MCB*, vol. 1, no. 1, pp. 53-68
- [35] Patrick CW. Mikos AG. McIntire LV. 1998, *Frontiers in tissue engineering*, 1st edition, Elsevier
- [36] Zoldan J. Karagiannis ED. Lee CY. Anderson DG. Langer R. Levenberg S. 2011, "The influence of scaffold elasticity on germ layer specification of human embryonic stem cells", *Biomaterials*, vol. 32, pp. 9612-9621
- [37] Engler AJ. Sen S. Sweeney HL. Discher DE. 2006, "Matrix elasticity direct stem cell lineage specification", *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 677-689
- [38] The Pancreas and Its Functions", [01/07/19], <https://columbiasurgery.org/pancreas/pancreas-and-its-functions>

- [39] “The pancreas”, [01/07/19], <http://pathology.jhu.edu/pancreas/BasicOverview1.php?area=ba>
- [40] Liu J. Zheng H. Poh P.S.P. Machens H. Schilling A. 2015 “Hydrogels for Engineering of Perfusable Vascular Networks”, *International Journal of molecular science*, vol.16, pp.15997-16016
- [41] Arda K. Ciledag N. Aktas E. 2011, “Quantitative Assessment of Normal Soft-Tissue Elasticity Using ShearWave Ultrasound Elastography”, *American journal of roentgenology*, vol. 197, no. 3, pp. 532-6
- [42] Rubiano A. Delitto D. 2018, “Viscoelastic properties of human pancreatic tumors and in vitro constructs to mimic mechanical properties”, *Acta Biomaterialia*, vol. 67, pp. 331-340
- [43] Claudia Duranti, Laura Carraresi, Angelica Sette, Matteo Stefanini, Tiziano Lottini, Silvia Crescioli, Olivia Crociani, Luisa Iamele, Hugo De Jonge, Ermanno Gherardi and Annarosa Arcangeli. Generation and characterization of novel recombinant antiHERG1 scFv antibodies for cancer molecular imaging. *Oncotarget*. 2018; 9(79):34972-34989. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26200>
- [44] Meike Beer, Nirmala Kuppalu, Matteo Stefanini, Holger Becker, Ingo Schulz, Sagar Manoli, Julia Schuette, Christian Schmees, Armando Casazza, Martin Stelzle and Annarosa Arcangeli. A novel microfluidic 3D platform for culturing pancreatic ductal adenocarcinoma cells: comparison with in vitro cultures and in vivo xenografts. *Sci Rep*. 2017; 7:1325. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01256-8>.
- [45] Jerome Mertz, 2019, *Introduction to Optical Microscopy*, W H Freeman & Co.
- [46] Constantin Ionescu-Tirgoviste, Paul A. Gagniuc, Elvira Gubceac, Liliana Mardare, Irinel Popescu, Simona Dima and Manuella Militaru. A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Sci Rep*. 2015; 5:14634. <https://doi.org/10.1038/srep14634>.
- [47] Bani ed altri autori, 2012, *Istologia Umana*, Idelson-Gnocchi, Napoli.
- [48] Pawelec K. et Al. 2019, “Properties and characterization of bone repair materials”, *Bone Repair Biomaterials*, 2nd Edition, pp. 65-102
- [49] Qian L. Zhao H. 2018, “Nanoindentation of soft biological materials”, *Micromachines*, vol. 9, no. 654, pp. 1-24
- [50] Sasaki N. 2012, “Viscoelastic properties of Biological Materials”, *Viscoelasticity – From theory to biological applications*, pp. 99-122
- [51] Banks H.T. et Al. 2011, “A brief review of elasticity and viscoelasticity”, *Advances in Applied Mathematics and Mechanics*, vol. 3, no. 1, pp. 1-51
- [52] Miller M.J., Patrick Jr. C.W. 2003 “Tissue engineering”, *Clinics in Plastic Surgery*, vol.30, no.1, pp. 91-103.
- [53] Czerner M. Felley L.S. 2015, “Determination of Elastic Modulus of Gelatin Gels by Indentation Experiments”, *Procedia Material Science*, vol.8, pp. 287-296
- [54] Girardo S. Träber N.2018, “Standardized microgel beads as elastic cell mechanical probes”, *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 6, no. 39, pp. 6245-6261
- [55] Kloxin AM. Kloxin CJ. Bowman CN. Anseth KS. 2010, “Mechanical properties of cellularly responsive hydrogels and their experimental determination”, *Advanced Materials*, vol. 22, no. 31, pp. 3484-4394
- [56] Brewin MP. Birch MJ. Mehta DJ. 2015, “Characterisation of elastic and acoustic properties of an agar-based tissue mimicking material.” *Annals of biomedical engineering*, vol. 43, no. 10, pp. 2587-95
- [57] Bazou, D.; Maimon, N.; Munn, L.L.; Gonzalez, I. Effects of Low Intensity Continuous Ultrasound (LICU) on Mouse Pancreatic Tumor Explants. *Appl. Sci*. 2017, 7, 1275.
- [58] Cafarelli A. Controlled ultrasound exposure for innovative therapeutic applications. XXIX Doctoral Cycle (2017).