



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di ricerca in ingegneria elettronica e delle telecomunicazioni
Scuola Politecnica, Dipartimento di Energia, Ingegneria dell'Informazione e Modelli Matematici.
Settore Scientifico Disciplinare ING-INF/01

Innovative ultrasound systems for preclinical studies: design and production of new instruments and set-ups for in vitro and in vivo experiments – Sistemi ad ultrasuoni innovativi per la sperimentazione preclinica: progettazione e produzione di nuovi strumenti e set-up per esperimenti in vitro ed in vivo

IL DOTTORE

Ing. Cristiano Corso

IL COORDINATORE

Chiar.mo Prof. Ing. Alessandro Busacca

IL TUTOR

Chiar.mo Prof. Ing. Patrizia Livreri

CICLO XXV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2016

*A Chiara e Sara,
le donne della mia vita*

INDICE

INDICE	3
INDICE DELLE FIGURE	6
INDICE DELLE TABELLE	10
INTRODUZIONE	11
CAPITOLO I – ULTRASUONI: CENNI TEORICI, GENERAZIONE E RILEVAZIONE..	14
1.1 – GLI ULTRASUONI	14
1.1.1 – <i>L’equazione del moto</i>	14
1.1.2 – <i>L’equazione d’onda in un mezzo non omogeneo</i>	15
1.2 – TIPI DI ONDE	16
1.2.1 – <i>Onde longitudinali</i>	16
1.2.2 – <i>Onde trasversali</i>	17
1.2.3 – <i>Onde superficiali</i>	17
1.2.4 – <i>Onde flessurali</i>	18
1.3 – GRANDEZZE CARATTERISTICHE DEGLI ULTRASUONI	18
1.4 – PROPAGAZIONE DELLE ONDE ULTRASONORE	21
1.4.1 – <i>La legge di Snell e la riflessione totale</i>	21
1.4.2 – <i>Coefficienti di trasmissione e riflessione in mezzi non viscosi</i>	22
1.4.3 – <i>La conversione di modo</i>	24
1.4.4 – <i>Attenuazione</i>	25
1.5 – GENERAZIONE DI ULTRASUONI	26
1.5.1 – <i>Piezoelettricità</i>	26
1.5.2 – <i>Ferroelettricità</i>	26
1.5.3 – <i>Fotoacustica</i>	27
1.5.4 – <i>Materiali</i>	27
1.6 – CAMPO EMESSO DA UN TRASDUTTORE	28
1.6.1 – <i>Near field e far field</i>	29
1.7 – TRASDUTTORE FOCALIZZATO	31
1.7.1 – <i>Distanza focale F</i>	31
1.7.2 – <i>Coefficiente di focalizzazione f</i>	32
1.7.3 – <i>Dimensioni focali</i>	32
1.8 – STRUTTURA DEL TRASDUTTORE	33

1.9 – TRASDUTTORI PHASED ARRAY	34
1.10 – IDROFONI	36
BIBLIOGRAFIA	38
CAPITOLO II – SET-UP PER TRIAL PRECLINICI SU PICCOLI ANIMALI	40
2.1 – RISONANZA MAGNETICA: PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO	40
2.2 – MRGFUS	42
2.3 – COMPONENTI DEL SET-UP PER ESPERIMENTI IN VIVO	43
2.3.1 – Sistema MR BioSpec 70/30	44
2.3.2 – Sistema ExAblate 2100 prostate module	44
2.4 – CRADDLE FUS	45
2.5 – INTERFACCIAMENTO FUS-MR	46
2.5.1 – Non-sampling output	47
2.5.2 – Trigger input	48
2.6 – RISULTATI	50
2.6.1 – Allineamento piani	50
2.6.2 – Steering	51
2.6.3 – Dimensioni focali	52
BIBLIOGRAFIA	54
CAPITOLO III – EVOLUZIONE DEL SET-UP PER ESPERIMENTI CELLULARI CON SISTEMA MRGFUS CLINICO	56
3.1 – SISTEMA MRGFUS CLINICO	56
3.2 – RIFLESSIONE E TRASMISSIONE MULTIWELL	57
3.3 – PROCEDURA SPERIMENTALE	59
3.4 – GELPAD	59
3.4.1 – Test misurazione velocità acustica nei gel	60
3.4.2 – Test assorbimento gel	62
3.5 – EVOLUZIONE DEL SET-UP	62
3.5.1 – Set-up I	63
3.5.2 – Set-up II	66
3.5.3 – Set-up III	66
3.6 – CONFRONTO FRA SET-UP	67
BIBLIOGRAFIA	69
CAPITOLO IV – SONOWELL	71

4.1 – OVERVIEW PARAMETRI US E CARATTERISTICHE TRASDUTTORI IN LETTERATURA	71
4.2 – CARATTERISTICHE TRASDUTTORI UTILIZZATI.....	73
4.2.1 - <i>Frequenze</i>	73
4.2.2 – <i>Intensità acustica e focalizzazione</i>	74
4.2.3 – <i>Dimensioni</i>	75
4.2.4 – <i>Campi emessi e piani focali</i>	75
4.2.5 – <i>Pilotaggio trasduttori</i>	79
4.3 – CIRCUITI DI MATCHING	80
4.4 – SISTEMI DI TERMOSTATAZIONE E DEGASSING	83
4.5 – HOLDER E TROUGHPUT	85
4.6 – STEPPER MOTOR E DRIVER	89
4.7 – ROUTINE DI GESTIONE DEL TRATTAMENTO	90
4.8 – MODULI SONOWELL	92
4.8.1 – <i>Generatore</i>	93
4.8.2 – <i>Sistema trattamento acqua</i>	93
4.8.3 – <i>Vasca e holder</i>	93
4.8.4 – <i>Terminale di controllo</i>	95
BIBLIOGRAFIA	96
 CAPITOLO V – RISULTATI DI RILEVAZIONE TEMPERATURA E FENOMENI	
CAVITATIVI	98
5.1 – RILEVAZIONE TEMPERATURA	98
5.2 – CAVITAZIONE	101
5.2.1 – <i>Problematiche relative alla cavitazione</i>	102
5.2.2 – <i>Rilevazione del fenomeno</i>	103
5.2.3 – <i>Indici di cavitazione in letteratura</i>	104
5.2.4 – <i>Misure spettrali e nuovo indice di cavitazione</i>	106
BIBLIOGRAFIA	116
 CONCLUSIONI.....	118
 PUBBLICAZIONI	120
 RINGRAZIAMENTI.....	121
 APPENDICE A: SCHEDA TECNICA SONOWELL.....	122

INDICE DELLE FIGURE

Fig. 1. Rappresentazione di un'onda longitudinale.....	17
Fig. 2. Rappresentazione di un'onda di Rayleigh	18
Fig. 3. Onde di Lamb di modo simmetrico (a) e asimmetrico (b).....	18
Fig. 4 Legge di Snell	21
Fig. 5 Matching layer	23
Fig. 6 Rappresentazione della conversione di modo. Le linee continue rappresentano onde longitudinali, quelle tratteggiate onde trasversali	25
Fig. 7 Riferimenti per il campo emesso da un trasduttore piano circolare [14]	28
Fig. 8 a) zone del campo emesso da un trasduttore piano circolare; b) grafico dell'intensità normalizzata emessa dal trasduttore lungo l'asse acustico del trasduttore; c) distribuzione trasversale dell'intensità [1]	30
Fig. 9 Struttura fisica di un trasduttore US con componenti evidenziati.....	33
Fig. 10 Illustrazione di come la scelta delle fasi dei segnali applicati agli elementi di un phased array possa modificare il fronte d'onda del fascio acustico totale.....	35
Fig. 11 Fasi del time reversal method; a) emissione da un solo elemento di un fronte d'onda sferico e aberrazione; b) rilevazione dell'eco causata dal riflettore acustico; c) adattamento delle fasi per contrastare l'aberrazione e focalizzare l'onda sul target [18]	36
Fig. 12 Componente trasversale e longitudinale del momento magnetico.....	41
Fig. 13 Cradle FUS modificato – vista posteriore.....	45
Fig. 14 Cradle FUS modificato – vista laterale	45
Fig. 15 Lettino AutoPac modificato per alloggiare la sonda FUS	46
Fig. 16 Segnale di blanking a) con T_r 33 ms e zoom b) degli impulsi negativi	48
Fig. 17 Scheda buffer per l'adattamento dei tempi di trigger.....	49
Fig. 18 Circuito per l'adattamento dei tempi di trigger a) vista interna b) box chiuso	50
Fig. 19 Immagini coronali MR di fantocci di idrogel distanti 3 mm; serie a) acquisizione normale; serie b) acquisizione con tentativo di disallineamento indotto	51
Fig. 20 Acquisizioni del test di steering; a) immagine di riferimento; b) steering -2,6 mm lungo l'asse x; c) steering +2,6 mm lungo l'asse x; d) steering +5,2 mm lungo l'asse y; e) steering -5,2 mm lungo l'asse y.....	52
Fig. 21 a) acquisizione immagine termica e b) effetto reale sul tessuto campione in seguito all'esposizione per 25 s ad un fascio acustico focalizzato con frequenza 2,5 MHz da 67 W emesso dal trasduttore del modulo prostate FUS.....	53

Fig. 22 Idrofono needle; punta da 1 mm e preamplificatore	57
Fig. 23 Set-up misura trasmissione multiwell; a) rilevazione di riferimento senza piastra; b) particolare delle misure con piastra.....	58
Fig. 24 Intensità normalizzata vs distanza dal trasduttore.....	58
Fig. 25 Particolare dell'interfaccia software del sistema FUS	59
Fig. 26 Set-up misura onda riflessa dal gelpad	61
Fig. 27 Set-up per valutazione assorbimento gel	62
Fig. 28 Schematizzazione set-up I.....	64
Fig. 29 a) mappa termica simulata con PZFlex, si nota un surriscaldamento del fondo della well; b) mappa termica ottenuta dal sistema MR durante un test sperimentale, si nota anche qui un surriscaldamento, area rossa, del fondo della well.....	64
Fig. 30 Risultati simulazione di deformazione dei materiali: a) lungo l'asse x, direzione di propagazione dell'onda, b) attorno all'asse z, normale al piano di visualizzazione dei risultati.....	65
Fig. 31 Schematizzazione set-up II	66
Fig. 32 Simulazione mappa termica set-up II.....	66
Fig. 33 Schematizzazione set-up III.....	67
Fig. 34 Le figure a), c) ed e) mostrano il posizionamento del segmento per il calcolo dei profili di temperatura nelle simulazioni termiche rispettivamente del primo, del secondo e del terzo set-up, le figure b), d) ed f) sono i profili di temperatura rispettivamente del primo, del secondo e del terzo set-up	68
Fig. 35 Simulazione campo emesso da un trasduttore phased array 4x4 da 1 MHz	76
Fig. 36 Simulazioni con Field II dei campi emessi dai trasduttori flat a singolo elemento con diametro 12 mm a) a 650 kHz e b) a 1 MHz	77
Fig. 37 Simulazioni con Field II dei campi emessi dai trasduttori flat a singolo elemento con diametro 12 mm a) a 2,4 MHz e b) a 4,5 MHz	78
Fig. 38 Risposta del trasduttore da 4,5 Mhz ad un impulso del segnale burst tone.....	79
Fig. 39 Ritardo di generazione dell'onda acustica. In giallo l'impulso pilota; in verde la risposta del trasduttore.....	80
Fig. 40 Schema elettrico equivalente di un trasduttore US	80
Fig. 41 Circuito passa basso del secondo ordine.....	81
Fig. 42 Board dei circuiti di matching realizzate con CAD EAGLE. a) 650 kHz; b) 1 MHz; c) 4,5 MHz; d) 2,4 MHz	82
Fig. 43 Fasi realizzative dei matching box.....	82
Fig. 44 Confronto tra le pressioni emesse dal trasduttore prima, in rosso, e dopo, in blu, il tuning del circuito di matching.....	83

Fig. 45 Warming test dei trasduttori da 650 kHz e 1 MHz	84
Fig. 46 Vista interna del modulo di trattamento dell'acqua del SonoWell	85
Fig. 47 Differenti soluzioni di posizionamento reciproco fra trasduttore e well: a) il trasduttore è posizionato sotto la well e l'accoppiamento è realizzato da un gel; b) la well è semisommersa in acqua ed è posizionata nel far field del campo emesso dal trasduttore; c) La well è sigillata da una pellicola e girata sottosopra in modo che il campo US non attraversi il polistirene, la well si trova nel far field; d) Il trasduttore è semisommerso nella soluzione cellulare.[25]	85
Fig. 48 Prima versione dell'holder per i trasduttori in plexiglass	87
Fig. 49 Visione prospettica del progetto CAD per la stampa 3D dell'holder	88
Fig. 50 Sezione del progetto CAD dell'holder che mostra le camere di refrigerazione dei trasduttori	88
Fig. 51 Schematizzazione di una multiwell da 24 pozzetti con riferimenti coordinati, in grigio le posizioni dei trasduttori	89
Fig. 52 Vista d'insieme dei moduli del SonoWell	92
Fig. 53 Modulo raffreddamento e degassing acqua	93
Fig. 54 Vasca, holder trasduttori e termostato	94
Fig. 55 Dettaglio di un trattamento su multiwell da 24	94
Fig. 56 Schematizzazione set-up misura; a) posizionamento termocoppie all'interno della well; b) pozzetti esaminati e disposizione termocoppie	98
Fig. 57 a) posizionamento materiale fonoassorbente all'interfaccia aria-acqua; b) punte termocoppie sostenute dal fonoassorbente	99
Fig. 58 Grafici delle temperature rilevate dalla termocoppie; sulla sinistra sono mostrati i risultati ottenuti con il 40% di duty cycle, sulla destra i valori delle stesse termocoppie con il 25% di duty cycle	100
Fig. 59 Schematizzazione del collasso asimmetrico di una bollla durante la cavitazione inerziale [3]	102
Fig. 60 a) schematizzazione del set-up di misura della cavitazione; b) foto set-up reale	107
Fig. 61 Spettro del rumore ambientale ed elettronico; i picchi sono introdotti dall'elettronica connessa all'idrofono	108
Fig. 62 Spettri medi ottenuti sonicando la soluzione a media concentrazione con a) 650 kHz e b) 1 MHz a parità di picco negativo di pressione	109
Fig. 63 Confronto fra gli spettri ottenuti con il trasduttore da 650 kHz e la concentrazione della soluzione media a vari valori di pressione	110
Fig. 64 Zoom centrato attorno ad 1 MHz del confronto fra gli spettri	110
Fig. 65 a) segnale nel dominio del tempo ricavato mediante FFT inversa; b) segnale privato della frequenza fondamentale e delle armoniche mediante deconvoluzione	112

Fig. 66 a) spettro dell'involuppo privato delle armoniche; b) spettro del segnale originale.....	113
Fig. 67 Spettro rilevato a 839 kPa; le finestre di frequenza con cui è stata calcolata la baseline coincidono con i rettangoli azzurri	114
Fig. 68 Grafico degli indici di cavitazione ottenuti.....	115

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1.....20

Tabella 2.....61

Tabella 3.....72

Tabella 4.....74

Tabella 5.....81

Tabella 6.....87

Tabella 7.....106

INTRODUZIONE

Da decine di anni l'utilizzo degli ultrasuoni in campo medico è una realtà diffusa. Oltre all'applicazione più comune che è quella dell'imaging ecografico, nel tempo si sono aggiunte applicazioni che vanno dal campo della fisioterapia, per la stimolazione della rigenerazione dei tendini, a quello dell'estetica, per il massaggio e l'eliminazione delle cellule grasse grazie all'effetto cavitativo.

Negli ultimi quindici anni è diventata una realtà clinica una tecnologia che, utilizzando gli ultrasuoni, permette di eseguire degli interventi chirurgici senza ricorrere a bisturi o aghi. Tale tecnologia sfrutta il calore causato da un'estrema focalizzazione di un fascio ultrasonoro in un volume di tessuto ristretto per provocare la necrosi della lesione.

Per “guidare” gli ultrasuoni, cioè per pianificarne e verificarne il percorso all'interno dei tessuti, si possono usare l'imaging ecografico o quello di risonanza magnetica. Se si utilizza la seconda tecnica si parla di Magnetic Resonance guided Focused Ultrasound Surgery, comunemente individuata dall'acronimo MRgFUS.

Attualmente il campo di impiego degli strumenti MRgFUS è limitato al trattamento di organi non vitali, come il trattamento dei fibromi uterini, il carcinoma alla mammella e la terapia palliativa del dolore nelle metastasi ossee. L'assenza dei permessi necessari ad altre applicazioni è causata dalla mancanza di adeguati studi preclinici preliminari. In alcuni casi, come per il trattamento della prostata e per la stimolazione cerebrale nei casi di dolore cronico o tremori essenziali, si è già arrivati alla fase di sperimentazione umana; in altri, quali i trattamenti di fegato, pancreas e reni, si è fermi al *proof of concept*. Un altro limite che la società scientifica sta tentando di superare è quello di trattare organi in movimento, a causa della respirazione o del battito cardiaco, e organi schermati da strutture ossee, come i polmoni ed il cuore.

L'idea alla base di parte della mia attività di ricerca è stata quella di fornire un set-up per studi preclinici su modelli animali di piccole dimensione unendo la risoluzione sub-millimetrica di un sistema di risonanza magnetica (MR) da 7 Tesla con il sistema HIFU (High Intensity Focused Ultrasound) che possiede la sonda più performante in commercio per piccoli volumi.

L'effetto biologico a livello cellulare che può essere provocato dagli ultrasuoni non si limita alla necrosi dei tessuti provocata dalla lisi cellulare, cioè la dissoluzione di una cellula causata dalla rottura della membrana. Agendo su diverse caratteristiche dell'onda acustica, quali l'intensità, la durata dell'impulso, il tempo di ripetizione e il tempo di trattamento totale, è possibile ottenere risultati differenti: si va dall'aumento della permeabilità della membrana cellulare, sfruttato per il drug delivery, alla stimolazione metabolica, usata per la produzione di alcuni antibiotici e per la rigenerazione tissutale,

alla distruzione temporanea della barriera ematoencefalica, sfruttata per il trattamento con chemioterapici del tessuto cerebrale normalmente non raggiungibile dal farmaco.

L'altra parte della mia attività in questi anni di dottorato è stata dedicata alla progettazione e produzione di uno strumento, per cui è stata presentata una richiesta di brevetto nel 2014, che permettesse di effettuare esperimenti cellulari con ultrasuoni. Le caratteristiche di tale strumento permettono di controllare accuratamente le condizioni sperimentali, quali temperatura, posizione del campione, caratteristiche dell'onda acustica, per ottenere un'elevata ripetibilità dei risultati. Particolare attenzione è stata data alla massimizzazione del throughput di trattamento per ridurre al minimo il tempo di esposizione dei campioni ad un ambiente non saturo di CO₂.

La mia attività di ricerca durante il periodo di dottorato è stata finanziata dalla Promedica Bioelectronics s.r.l. nell'ambito dei progetti PON01-01059 e PON02-00643-3613586.

Tale società è attiva da 25 anni nel settore della strumentazione elettromedicale clinica e il suo settore R&D è interessato ad affrontare le esigenze non soddisfatte in termini di strumentazione tecnica per gli studi pre-clinici su sistemi modello. Promedica Bioelectronics vanta partnership con prestigiosi istituti di ricerca pubblici tra cui i dipartimenti di Biopatologia e Biotecnologie Mediche e Forensi (DIBIMEF) e di Discipline Chirurgiche, Oncologiche e Stomatologiche (DiChirOnS) del Policlinico di Palermo, i dipartimenti di Scienze radiologiche, di Medicina Sperimentale e di Sanità Pubblica e delle Malattie infettive dell'università di Roma "La Sapienza" e l'istituto ortopedico Rizzoli di Bologna. Inoltre è tra i fondatori del consorzio PiTecnBio.

Nel dicembre 2013 Promedica Bioelectronics ha inaugurato un nuovo laboratorio di ricerca nei locali del DIBIMEF del Policlinico di Palermo. Tale struttura ospita, oltre ad un laboratorio elettro-acustico da me allestito, un laboratorio biologico, un laboratorio molecolare ed un'area MR. In questi locali è stata installata una risonanza magnetica 7T prodotta dalla Bruker (Ettlingen, Germania) per ricerca preclinica su piccoli animali ed un modulo MRgFUS per ricerca della InSightec (Haifa, Israele). All'interno di tale laboratorio lavorano ricercatori con diverso background creando un ambiente stimolante multidisciplinare formato da fisici, radiologi, ingegneri, microbiologi cellulari e biologi animali. Nel 2014 la Promedica Bioelectronics ha presentato la sua prima richiesta di brevetto, riguardante lo strumento per sperimentazione su cellule di cui si discuterà nel capitolo IV di questo lavoro di tesi, all'ufficio brevetti di Roma, nel 2015 tale richiesta è stata ampliata al PCT (Patent Cooperation Treaty) estendendone la validità a livello mondiale.

Nel primo capitolo del presente lavoro di tesi tratterò la teoria della propagazione delle onde sonore in generale. In seguito illustrerò i vari tipi di trasduttore per la generazione di ultrasuoni e i materiali utilizzati per la realizzazione.

Il secondo capitolo verterà sul set-up per esperimenti su piccoli animali. Dopo aver accennato ai principi di funzionamento dell'imaging di risonanza magnetica ed aver presentato i due macchinari

presenti in laboratorio mostrerò le modifiche hardware apportate chiarendone le necessità. Inoltre illustrerò i collegamenti necessari ad interfacciare i due sistemi e le soluzioni adottate per rendere i segnali compatibili. Infine discuterò dei risultati ottenuti.

Nel capitolo III si percorreranno gli step evolutivi del set-up per esperimenti in vitro condotti con il sistema ExAblate 2100 per fibromi uterini di proprietà del DIBIMEF del Policlinico di Palermo. In particolare si mostrerà come scelte operative e soluzioni adottate in seguito a simulazioni software abbiano reso il protocollo di sperimentazione affetto dal minor numero possibile di cause di variabilità.

Le necessità alla base dello sviluppo di un nuovo strumento per esperimenti cellulari saranno trattate nella prima parte del quarto capitolo. Inoltre saranno descritti i vari componenti dello strumento argomentando le soluzioni adottate per massimizzare la ripetibilità degli esperimenti mantenendo le condizioni sperimentali costanti.

Nel quinto capitolo sarà affrontato il problema della rilevazione del fenomeno cavitativo durante i test. Saranno presentati i risultati di analisi in frequenza di spettri di segnali acquisiti durante la sonicazione e come sia possibile ricavare un indice robusto che indichi il livello di cavitazione. In questo capitolo saranno anche illustrati i risultati dei test di rilevazione dell'innalzamento della temperatura all'interno della well durante la sonicazione.

Un ultimo capitolo conterrà le conclusioni di tutta la mia attività di ricerca, i punti irrisolti e gli spunti per un futuro sviluppo.

CAPITOLO I – Ultrasuoni: cenni teorici, generazione e rilevazione

1.1 – Gli ultrasuoni

Il termine ultrasuoni (US) indica onde meccaniche elastiche con frequenza superiore alla soglia di udibilità umana, tipicamente 20 kHz. Esiste anche un limite superiore per la frequenza di un'onda ultrasonica dipendente dalla minima distanza atomica nei solidi, 10^{13} Hz [1].

Queste onde sono costituite da vibrazioni elastiche di particelle di materia e possono quindi avvenire in un mezzo solido, liquido o gassoso. Non possono esistere in assenza di materia, contrariamente alle onde luminose che, essendo di natura elettromagnetica, si propagano anche nel vuoto.

Come per tutti i fenomeni ondulatori, anche gli ultrasuoni sono caratterizzati da parametri fisici quali la frequenza, la lunghezza d'onda, la velocità di propagazione e l'intensità. Inoltre nella loro propagazione, analogamente alle onde luminose, subiscono i fenomeni della riflessione, rifrazione e diffrazione quando incontrano discontinuità o ostacoli. Altro aspetto peculiare derivante dalla frequenza elevata è la direzionalità, per cui gli ultrasuoni si propagano sotto forma di fasci rettilinei, come i raggi luminosi nell'ottica geometrica.

La teoria dell'elasticità descrive formalmente la propagazione degli ultrasuoni. Tale teoria si basa sulla fondamentale ipotesi che i corpi materiali si comportino come mezzi continui, ipotesi applicabile per lunghezze d'onda acustiche molto maggiori delle distanze interatomiche. Nella teoria classica dell'elasticità, un mezzo è rappresentato da un continuo composto di volumi infinitesimi che si comportano come masse inerziali, legate fra loro da forze elastiche. Ne consegue che se spostati dall'equilibrio, essi sono soggetti ad una forza di richiamo proporzionale allo spostamento; ciò dà luogo ad oscillazioni armoniche. Attraverso il moto oscillatorio l'energia del volume elementare è continuamente trasformata da elastica, cioè potenziale, a cinetica, e viceversa. Parte di questa energia è trasformata irreversibilmente in calore per effetto dei vari meccanismi di perdita. Per la propagazione delle onde sonore occorre un mezzo materiale; la velocità con cui le onde si propagano dipende dalla densità, dalle proprietà e dalla temperatura del mezzo. A differenza delle onde sonore che sono longitudinali, le onde ultrasoniche possono essere di diversi tipi: Onde longitudinali, Onde trasversali, Onde superficiali e Onde Lamb.

1.1.1 – L'equazione del moto

Esistono molti testi che disquisiscono sulla teoria della propagazione degli ultrasuoni ma lo standard è ancora il libro di Morse e Ingard "Theoretical Acoustics" [2]. In prima approssimazione conviene considerare il mezzo in cui si propagano gli US stazionario, con una densità $\rho(\mathbf{r})$ dipendente dal vettore

posizione $\mathbf{r}$ nello spazio tridimensionale. L'approccio classico, inoltre, prevede di affrontare la trattazione nel caso unidimensionale e poi estendere i risultati al caso tridimensionale.

Lo stato del mezzo sarà perturbato dall'onda di pressione che si propaga e la pressione totale, p_T , nel punto x e al variare del tempo può essere scritta come:

$$p_T(x, t) = p_0 + p(x, T) \quad (1.1)$$

dove p_0 è la pressione statica del mezzo e p è la perturbazione, chiamata pressione acustica, causata dall'onda che si propaga nel mezzo. Anche la densità del mezzo risulterà perturbata e, in maniera analoga alla pressione, la densità totale può essere espressa come:

$$\rho_T(x, t) = \rho_0(x) + \rho(x, T) \quad (1.2)$$

Un'onda ultrasonica che si propaga in un mezzo non causa solo una variazione di pressione e di densità. Considerando il mezzo come costituito da un insieme di volumi infinitesimi di materiale all'interno dei quali la pressione e la densità possono ritenersi uguali in tutti i punti, il passaggio dell'onda causa uno spostamento $\zeta(x, t)$ di tali volumi con velocità $u(x, t)$.

Assumendo che l'onda provochi perturbazioni molto piccole, cioè che siano valide le seguenti condizioni:

$$\left| \frac{p}{p_0} \right| \ll 1 ; \left| \frac{\rho}{\rho_0} \right| \ll 1 \quad (1.3)$$

l'equazione del moto può essere espressa da:

$$-\frac{\partial p}{\partial x} = \rho_0 \frac{\partial u}{\partial t} \quad (1.4)$$

1.1.2 – L'equazione d'onda in un mezzo non omogeneo

In accordo con quanto fatto da Hill, Bamber e ter Haar [3] si può ricavare un'equazione d'onda per la pressione acustica,

$$\frac{\partial^2 p}{\partial x^2} - \rho_0 \beta_0 \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} = \left(\frac{\partial}{\partial x} \ln \rho_0 \right) \frac{\partial p}{\partial x} \quad (1.5)$$

dove β_0 è la compressibilità adiabatica del mezzo. Introducendo i termini di fluttuazione spaziale di densità e compressibilità,

$$\begin{aligned}\tilde{\rho} &= \frac{\rho_0 - \bar{\rho}}{\bar{\rho}} \\ \tilde{\beta} &= \frac{\beta_0 - \bar{\beta}}{\bar{\beta}}\end{aligned}\tag{1.6}$$

in cui $\bar{\rho}$ e $\bar{\beta}$ sono i valori medi spaziali, ed espandendo la trattazione al caso tridimensionale, dopo diverse manipolazioni si ottiene la seguente relazione:

$$\nabla^2 p - \bar{\rho}\bar{\beta} \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} = \overline{\rho\beta} \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} + \nabla \cdot [\tilde{\rho}\nabla p]\tag{1.7}$$

E' importante notare come i termini di fluttuazione spaziale siano presenti solo a secondo membro. Tali fluttuazioni rappresentano la capacità del materiale di dare vita al fenomeno dello scattering, o diffusione, dell'onda che si propaga al suo interno. Solitamente ci si riferisce ai due termini che formano il secondo membro come ai "termini sorgente" dello scattering. In tal modo la relazione è composta da una parte, il primo membro, legata alla propagazione uniforme e un'altra, il secondo membro, legata alla propagazione dell'onda diffusa.

1.2 – Tipi di onde

La propagazione delle onde ultrasonore dipende sia dal mezzo in cui essa avviene sia dal modo in cui l'onda è generata. La caratterizzazione delle onde dipende dalla direzione di vibrazione e dalla direzione di propagazione. A seconda delle caratteristiche oscillatorie delle particelle le onde si possono classificare in quattro categorie:

- Onde longitudinali (o di compressione);
- Onde trasversali (o di taglio);
- Onde superficiali (o di Rayleigh);
- Onde flessurali (o di Lamb).

1.2.1 – Onde longitudinali

Quando lo spostamento delle particelle, rispetto alla posizione di riposo, avviene nella stessa direzione di propagazione del fascio ultrasonoro si parla di onde longitudinali, anche chiamate onde di compressione. All'interno del mezzo si creano delle fasi alternate di rarefazione e compressione come

mostrato in fig.1. La distanza fra due massimi di spostamento consecutivi rappresenta la lunghezza d'onda λ .

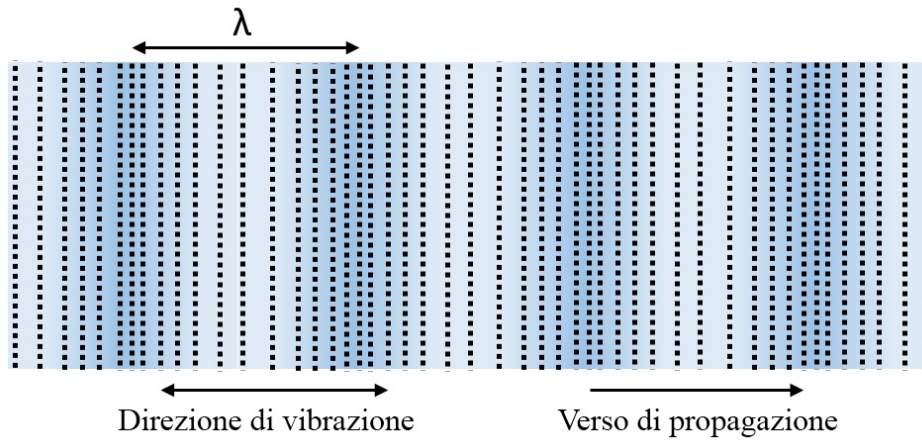


Fig. 1. Rappresentazione di un'onda longitudinale

Queste sono le uniche onde che possono propagarsi in un mezzo fluido (liquido o gas)

1.2.2 – Onde trasversali

In questa categoria di onde la direzione di vibrazione delle onde è ortogonale a quella di propagazione dell'onda. La forza che causa lo spostamento delle particelle è dovuta ad una tensione di taglio, e quindi perpendicolare alla direzione del fascio ultrasonoro. Per tale motivo non si potrebbe parlare di pressione associata all'onda; secondo la meccanica classica la pressione è il rapporto fra la forza normale ad una superficie e la superficie stessa, ma nel caso di tensioni di taglio questa è parallela alla superficie in esame. Tali tipi di onde si propagano solo nei solidi poiché i fluidi non sopportano sforzi di taglio. In realtà esistono alcuni fluidi superviscosi che permettono il propagarsi di onde trasversali in essi per pochi millimetri e con un'altissima attenuazione.

Anche in questo caso la lunghezza d'onda è definita come la distanza fra due massimi di spostamento consecutivi.

1.2.3 – Onde superficiali

Le onde superficiali si creano alla superficie di separazione fra due mezzi, di cui uno solido, derivanti dalla composizione di onde longitudinali e di onde trasversali. Generalmente il moto oscillatorio delle particelle risultante è di tipo ellittico. Le onde superficiali hanno una componente parallela all'interfaccia di separazione dei mezzi inferiore rispetto alla componente ortogonale; il rapporto fra le due componenti dipende dai parametri elastici del mezzo.

Le onde superficiali, si propagano soltanto lungo un sottile strato superficiale del solido, avente profondità dell'ordine di una lunghezza d'onda, come mostrato in Fig.2; vengono anche chiamate onde di Rayleigh poiché lord Rayleigh fu il primo a studiarne il meccanismo, in relazione alle onde sismiche.

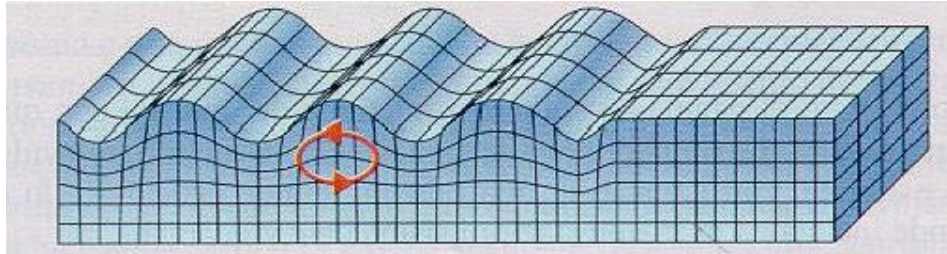


Fig. 2. Rappresentazione di un'onda di Rayleigh

La peculiarità di questo tipo di onde consiste nel fatto che seguono nella loro propagazione le eventuali concavità e convessità della forma del solido a differenza dei tipi di onde precedenti che si propagano solo in linea retta.

1.2.4 – Onde flessurali

Nei solidi di piccolo spessore si possono generare onde flessurali, chiamate anche onde di Lamb, che interessano tutta la sezione. Come nel caso delle onde superficiali, anche per questo tipo di onde le particelle sono sottoposte a oscillazioni lungo due direzioni perpendicolari.

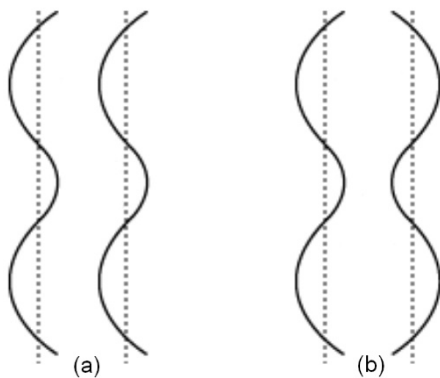


Fig. 3. Onde di Lamb di modo simmetrico (a) e asimmetrico (b)

Anche se i modi vibrazionali sono infiniti esistono solo due tipi fondamentali di onde di Lamb, le onde di modo simmetrico e quelle di modo asimmetrico; all'interno di entrambi i modi ci sono onde che partono dall'ordine zero per diventare via via più complesse. I due modi fondamentali sono mostrati in Fig.3.

La particolarità delle onde di Lamb risiede nel fatto che la velocità di fase non dipende solamente dalle caratteristiche del mezzo e dalla frequenza dell'onda ma anche dal modo e dall'ordine di vibrazione.

1.3 – Grandezze caratteristiche degli ultrasuoni

Per onde di pressione di tipo sinusoidale, la soluzione dell'equazione d'onda unidimensionale 1.5 è:

$$p = p_1 \sin(\omega t - kt) + p_2 \sin(\omega t + kt) \quad (1.8)$$

Il primo termine indica l'onda diretta, il secondo l'onda inversa. Tale soluzione può anche scriversi in forma esponenziale:

$$p = p'_1 e^{i(\omega t - kt)} + p'_2 e^{i(\omega t + kt)} \quad (1.9)$$

dove $\omega = 2\pi f$ è la pulsazione, f è la frequenza e $k = 2\pi/\lambda$ il numero d'onda. La frequenza e la lunghezza d'onda sono legate dalla relazione:

$$c = f\lambda = \frac{\omega}{k} \quad (1.10)$$

c è la velocità con cui l'onda si propaga, da non confondersi con la velocità di spostamento delle particelle u , e dipende dalle proprietà fisiche del mezzo. Per un'onda longitudinale la velocità di propagazione è:

$$c = \sqrt{\rho_0 \beta_0} \quad (1.11)$$

La pressione acustica p e la velocità di spostamento delle particelle u possono essere combinate per ottenere altre due grandezze caratteristiche. Il loro rapporto $p/u = Z$ dà l'impedenza acustica. In generale questa grandezza è un numero complesso e dipende dal profilo del fronte del fascio ultrasonoro. Per un'onda sferica l'impedenza acustica è:

$$Z = \rho_0 c \left(1 + \frac{iA}{r} \right) \quad (1.12)$$

dove A è una costante ed r è il raggio di curvatura del fronte d'onda. Se r è molto grande il secondo termine scompare. Al limite, per le onde piane, l'impedenza acustica è un numero reale che dipende solamente dalle proprietà del mezzo e perciò prende il nome di impedenza acustica caratteristica. Valori tipici di densità, velocità e impedenze acustiche caratteristiche di diversi tessuti sono riportati nella tabella 1 [4][5][6][7][8][9].

La media temporale del prodotto di p e u fornisce l'intensità acustica I :

$$I = \langle pu \rangle \quad (1.13)$$

L'intensità acustica rappresenta il flusso di energia per unità di tempo attraverso l'unità di superficie. Se consideriamo un'onda piana l'intensità è data dalle seguenti relazioni:

$$I = \frac{1}{2} Z u_0^2 = \frac{1}{2} \frac{p_0^2}{Z} \quad (1.14)$$

E' da notare il parallelismo di queste relazioni con quelle elettriche che forniscono la potenza elettrica in funzione della tensione o della corrente.

Integrando l'intensità acustica su una superficie si ottiene la potenza totale transitata attraverso la superficie:

$$W = \int I dS \quad (1.15)$$

Se un oggetto si trova sulla traiettoria di un fascio ultrasonoro su di esso agirà una forza chiamata radiation force. Per un'onda piana che incide normalmente su un target perfettamente assorbente la radiation force è data dalla relazione:

$$F = \frac{W}{c} = \frac{IA}{c} \quad (1.16)$$

con A area del fascio intercettata dal target.

Tabella 1

Tissue or Material	ρ [g/cm³]	c [m/sec]	Z [MRayl]
Air	0.00012	330	0.0004
Water	1	1480	1.48
Blood	1.055	1575	1.66
Fat	0.95	1450	1.38
Liver	1.06	1590	1.69
Kidney	1.05	1570	1.65
Brain	1.03	1550	1.60
Heart	1.045	1570	1.64
Muscle (along the fibers)	1.065	1575	1.68
Muscle (across the fibers)	1.065	1590	1.69
Skin	1.15	1730	1.99
Eye (lens)	1.04	1650	1.72
Eye (vitreous humor)	1.01	1525	1.54
Bone axial (longitudinal waves)	1.9	4080	7.75
Bone axial (shear waves)	1.9	2800	5.32
Teeth	2.2	3600	7.92

1.4 – Propagazione delle onde ultrasonore

I fenomeni legati alla propagazione delle onde ultrasonore sono nella maggior parte dei casi molto simili a quelli ottici. Ad esempio la legge di Snell, che lega gli angoli di incidenza e di trasmissione di un'onda all'interfaccia fra due mezzi differenti, è valida anche per le onde sonore.

1.4.1 – La legge di Snell e la riflessione totale

Quando un'onda acustica durante la sua propagazione incontra un'interfaccia fra due mezzi con proprietà acustiche diverse parte della sua energia sarà riflessa e parte sarà trasmessa. L'onda riflessa tornerà indietro nel primo mezzo con un angolo di riflessione pari a quello di incidenza, l'onda trasmessa sarà rifratta e si propagherà nel secondo mezzo, come mostrato in Fig.4. Il legame fra l'angolo di incidenza e quello di trasmissione dipende dalla natura dei due mezzi ed è dato dalla legge di Snell:

$$\frac{c_1}{\sin \theta_i} = \frac{c_2}{\sin \theta_T} \quad (1.17)$$

c_1 e c_2 sono le velocità dell'onda ultrasonora nei mezzi 1 e 2, θ_i e θ_T sono, rispettivamente, l'angolo d'incidenza e quello di trasmissione, rispetto alla normale alla superficie d'interfaccia.

Considerando un'onda longitudinale che passa attraverso l'interfaccia fra due mezzi non viscosi, se c_2 è maggiore di c_1 anche $\sin \theta_T$ sarà maggiore di $\sin \theta_i$ e di conseguenza lo stesso legame si avrà fra gli angoli, $\theta_T > \theta_i$. Se aumenta l'angolo d'incidenza aumenterà anche l'angolo di trasmissione, fino a raggiungere un valore massimo pari a $\frac{\pi}{2}$ per cui $\sin \theta_T = 1$. In questa condizione l'onda trasmessa viaggerà lungo lo strato di separazione fra i due mezzi. Aumentando ulteriormente θ_i , la legge di

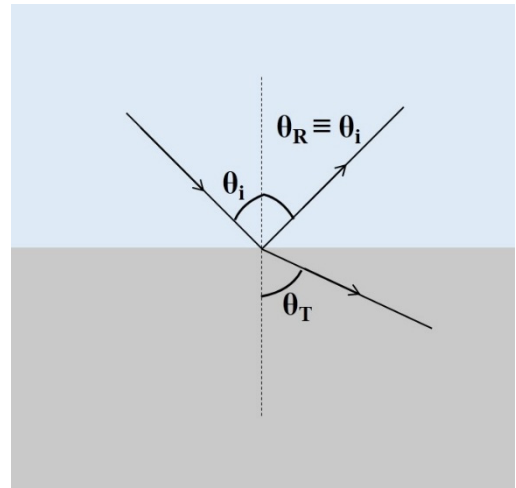


Fig. 4 Legge di Snell

Snell non è più valida in quanto dovrebbe essere $\sin \theta_T > 1$; ciò significa che l'onda non può penetrare nel secondo mezzo e tutta l'energia è riflessa. L'angolo d'incidenza per cui si ottiene tale condizione prende il nome di angolo critico.

1.4.2 – Coefficienti di trasmissione e riflessione in mezzi non viscosi

Come esposto nel *par.1.2.2* in mezzi non viscosi non possono propagarsi onde trasversali. Per tale motivo, quanto detto in questo paragrafo riguarderà solo onde longitudinali.

Considerando la Fig.4, la pressione nel mezzo 1 attraverso cui arriva l'onda incidente è composta dalla pressione incidente P_i e da quella riflessa P_R . Nel mezzo 2, invece, è presente la sola pressione trasmessa P_T . All'interfaccia fra i due mezzi la pressione deve essere uguale, quindi si può scrivere che:

$$p_i + p_R = p_T \quad (1.18)$$

Lungo l'interfaccia i due mezzi devono essere perfettamente a contatto e quindi le particelle dei due mezzi lungo lo strato d'interfaccia dovranno muoversi in accordo. Possiamo, quindi, eguagliare gli spostamenti delle particelle nei due mezzi all'interfaccia:

$$\xi_i \cos \theta_i - \xi_R \cos \theta_R = \xi_T \cos \theta_T \quad (1.19)$$

L'uguaglianza degli spostamenti implica anche quella delle velocità delle particelle. Per cui derivando nel tempo l'equazione precedente la relazione rimane valida:

$$u_i \cos \theta_i - u_R \cos \theta_R = u_T \cos \theta_T \quad (1.20)$$

Ricordando la definizione di impedenza acustica, rapporto fra pressione e velocità della particella, si trova un legame fra p e u :

$$p = Z \cdot u \quad (1.21)$$

La relazione precedente diventa:

$$\frac{p_i}{Z_1} \cos \theta_i - \frac{p_R}{Z_1} \cos \theta_R = \frac{p_T}{Z_2} \cos \theta_T \quad (1.22)$$

Ora è possibile ricavare i coefficienti di riflessione e trasmissione:

$$R = \frac{p_R}{p_i} = \frac{Z_2 \cos \theta_i - Z_1 \cos \theta_T}{Z_2 \cos \theta_i + Z_1 \cos \theta_T} \quad (1.23)$$

$$T = \frac{p_T}{p_i} = \frac{2Z_2 \cos \theta_i}{Z_2 \cos \theta_i + Z_1 \cos \theta_T} \quad (1.24)$$

In alcuni casi è utile calcolare dei coefficienti di riflessione e di trasmissione dell'intensità acustica. Ricordando che $I = p^2/2Z$ si ottengono i seguenti coefficienti:

$$\frac{I_R}{I_i} = \frac{p_R^2}{2Z_1} \cdot \frac{2Z_1}{p_i^2} = \frac{p_R^2}{p_i^2} = R^2 \quad (1.25)$$

$$\frac{I_T}{I_i} = \frac{p_T^2}{2Z_2} \cdot \frac{2Z_1}{p_i^2} = \frac{Z_1}{Z_2} \cdot \frac{p_T^2}{p_i^2} = \frac{Z_1}{Z_2} \cdot T^2 \quad (1.26)$$

Dalle formule si intuisce che tanto più Z_1 e Z_2 sono simili minore sarà l'energia riflessa. L'impedenza acustica dell'aria è molto diversa da quella dei liquidi o dei tessuti umani, tabella 1. Per tale motivo quando un fascio acustico incontra uno strato d'aria nel suo percorso la porzione di energia trasmessa cala drasticamente e si crea un'eco dovuto all'onda riflessa. Questo effetto, che nelle applicazioni tipiche si cerca di evitare, in alcuni casi può essere sfruttato, ad esempio piccole bolle di gas possono essere introdotte nel corpo per agire da mezzo di contrasto durante l'imaging ecografico.

Anche l'impedenza acustica dei materiali comunemente utilizzati per realizzare i trasduttori è diversa da quella dei tessuti. In questo caso l'onda riflessa, oltre a poter rendere inefficienti gli ultrasuoni a causa della diminuzione dell'energia trasmessa, può causare un surriscaldamento fino alla rottura del trasduttore. Per evitare un'eccessiva riflessione si realizza un layer di matching fra la superficie del trasduttore e quella del mezzo.

Consideriamo una struttura a tre strati come in Fig. 5. L'onda acustica che viaggia nel mezzo 1, con impedenza acustica Z_1 , ad una intensità acustica I_1 incontra l'interfaccia fra i mezzi 1 e 2. Parte dell'onda sarà riflessa e parte trasmessa. L'intensità trasmessa I_2 si propaga nel mezzo 2 e incontrerà l'interfaccia fra i mezzi 2 e 3. Anche in questa interfaccia solo una parte dell'intensità, I_3 , sarà trasmessa nel terzo mezzo con impedenza acustica Z_3 . Per semplicità assumiamo che le interfacce siano entrambe planari e che l'incidenza sia normale.

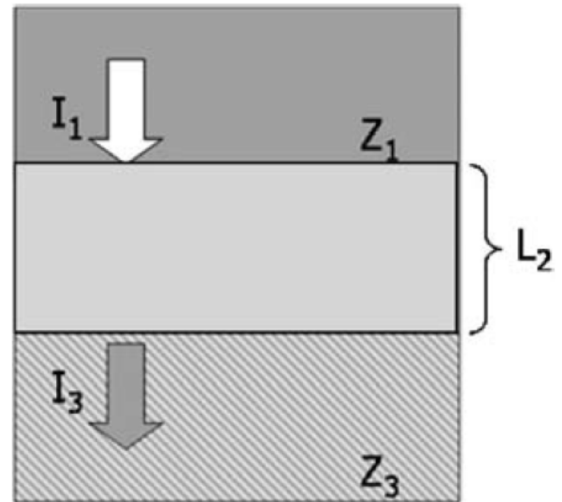


Fig. 5 Matching layer

Kinsler e Frey [10] hanno ricavato nel loro testo il coefficiente di trasmissione d'intensità

I_3/I_1 in funzione delle impedenze acustiche e dello spessore L_2 e del numero d'onda K_2 dello strato di matching:

$$\frac{I_3}{I_1} = \frac{4Z_1Z_3}{(Z_3 + Z_1)^2 \cdot \cos^2(K_2L_2) + \left(Z_2 + \frac{Z_1Z_3}{Z_2}\right)^2 \cdot \sin^2(K_2L_2)} \quad (1.27)$$

Si possono distinguere tre casi particolari. I primi due sono:

- Se lo spessore del matching layer è molto piccolo rispetto alla lunghezza d'onda del fascio acustico, $L_2 \ll \lambda_2/4$, il termine $\sin$ a denominatore è trascurabile e il termine $\cos$ è circa pari a 1;
- Se lo spessore del matching layer soddisfa la condizione $L_2 = n\lambda_2/2$, avremo nuovamente che il termine $\sin$ è trascurabile e il $\cos$ è circa pari a 1.

In entrambi i casi il coefficiente di trasmissione sarà indipendente dalle caratteristiche dello strato di matching:

$$\frac{I_3}{I_1} = \frac{4Z_1Z_3}{(Z_3 + Z_1)^2} \quad (1.28)$$

Bisogna specificare che tale formula non è più vera per $Z_2 \ll Z_1 \cdot Z_3$, in questo caso il termine $Z_1 \cdot Z_3/Z_2$ tende ad infinito e l'approssimazione dovuta al fattore $\sin$ non è più valida.

Il terzo caso speciale si ha quando $L_2 = (2n - 1)\lambda_2/4$, cioè quando lo spessore del matching layer è un multiplo dispari di $\lambda_2/4$. Sotto questa condizione il coefficiente di trasmissione diventa:

$$\frac{I_3}{I_1} = \frac{4Z_1Z_3}{\left(Z_2 + \frac{Z_1Z_3}{Z_2}\right)^2} \quad (1.29)$$

Se si sceglie accuratamente il materiale dello strato intermedio in modo tale che risulti $Z_2 = \sqrt{Z_1Z_3}$, si può ottenere un coefficiente di trasmissione pari a 1, cioè non si ha nessuna riflessione e tutta l'energia acustica è trasferita al terzo strato.

1.4.3 – La conversione di modo

Come già mostrato nel par. 1.4.1, gli ultrasuoni possono propagarsi in un mezzo viscoso sotto forma sia di onde longitudinali che trasversali. In particolare quando si considera un'interfaccia, in cui almeno

uno dei due mezzi sia un solido, è possibile, sotto opportune condizioni, che un'onda longitudinale venga trasformata in un'onda trasversale e viceversa. E' anche possibile che da una sola onda incidente si generino due onde differenti, una trasversale ed una longitudinale, sia in riflessione che in trasmissione. Questo fenomeno viene chiamato conversione di modo.

Gli angoli di riflessione e trasmissione obbediscono alla legge di Snell anche nel caso di conversione di modo. Bisogna tener conto, però, che nello stesso mezzo le velocità di propagazione dei due tipi di onde non coincidono. Per tale motivo, quando un'onda longitudinale incide su un'interfaccia con un angolo θ_i , se sono soddisfatte le condizioni per avere una conversione di modo in riflessione, l'onda riflessa

longitudinale si propagerà con un angolo θ_{Rlong} pari a quello d'incidenza mentre l'onda riflessa trasversale si propagerà con un angolo θ_{Rtrav} diverso da θ_i , come mostrato in Fig.6.

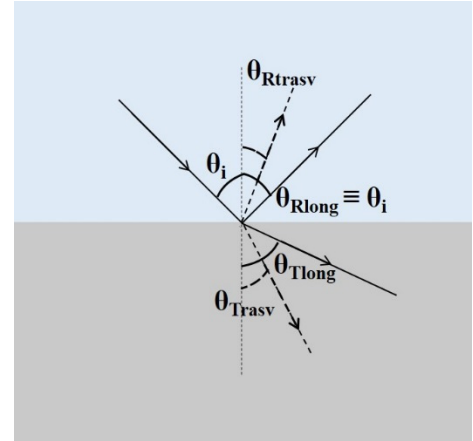


Fig. 6 Rappresentazione della conversione di modo. Le linee continue rappresentano onde longitudinali, quelle tratteggiate onde trasversali

$$\frac{c_l}{\sin \theta_i} = \frac{c_l}{\sin \theta_{Rlong}} = \frac{c_s}{\sin \theta_{Rtrav}} \quad (1.30)$$

1.4.4 – Attenuazione

Un fascio ultrasonoro che si propaga in un mezzo si estingue dopo aver percorso una determinata distanza. Tale distanza dipende dall'ampiezza iniziale dell'onda, dalla sua frequenza e dalle proprietà del mezzo.

Si riconoscono due cause principali dell'attenuazione del fascio: l'attenuazione geometrica e l'attenuazione fisica. La prima è indipendente dal tipo di mezzo in cui si propaga l'onda e si basa su considerazioni geometriche. Infatti, il campo ultrasonoro man mano che si allontana dalla sorgente tende ad irradiarsi su aree via via maggiori. Per tale motivo l'intensità diminuisce in maniera proporzionale al quadrato della distanza percorsa.

L'attenuazione fisica dipende strettamente dal mezzo in cui l'onda si propaga ed ha un andamento di tipo esponenziale. I fenomeni che causano questo tipo di attenuazione sono due:

- Assorbimento;
- Diffusione.

L'assorbimento è legato alle caratteristiche termoelastiche del mezzo. Quando un'onda acustica attraversa il mezzo le particelle scorrono relativamente fra loro per permetterne la propagazione. Tale

scorrimento è ostacolato dalla viscosità del mezzo che causa una dissipazione di energia sotto forma di calore. Ovviamente il fenomeno dell'assorbimento è molto più complesso in mezzi anisotropi, in cui cioè le caratteristiche elastiche cambiano a seconda della direzione di propagazione.

La diffusione, o scattering, è legata alla presenza e dimensione di difetti nel mezzo e alla velocità dell'onda. Quando un fascio ultrasonoro incontra dei difetti o delle discontinuità di dimensioni paragonabili alla sua lunghezza d'onda, il fronte non si propaga più regolarmente ma subisce delle distorsioni. Non si può più usare il concetto di raggio geometrico per descrivere la sua propagazione.

Per avere informazioni sull'entità dell'assorbimento si può utilizzare una scala, in decibel, ottenuta tramite la seguente relazione:

$$dB = 20 \log \frac{I_1}{I_2} \quad (1.31)$$

in cui I_1 e I_2 sono rispettivamente le intensità del fascio prima e dopo l'attenuazione.

1.5 – Generazione di ultrasuoni

Per la generazione di onde ultrasonore si possono sfruttare tre principi fisici, la piezoelettricità, la ferroelettricità e la fotoacustica.

1.5.1 – Piezoelettricità

La piezoelettricità è la proprietà di alcuni materiali cristallini, chiamati cristalli piezoelettrici, di generare una differenza di potenziale quando sono soggetti ad una deformazione meccanica elastica e viceversa. Nel caso in cui si generi una polarizzazione elettrica a causa di una sollecitazione meccanica si parla di effetto piezoelettrico diretto, quando invece si crea una deformazione a causa di una tensione applicata si parla di effetto piezoelettrico inverso.

La frequenza emessa, nel caso di effetto inverso, dipende dalle caratteristiche fisiche del cristallo e dalla geometria.

1.5.2 – Ferroelettricità

Il fenomeno della ferroelettricità è del tutto simile a quello piezoelettrico. Si utilizzano materiali ferroelettrici o piezoceramici. I materiali piezoceramici si ottengono per polarizzazione di piastrine ceramiche. La polarizzazione si effettua applicando un campo elettrico costante e riscaldando il materiale per breve tempo fino al superamento della temperatura di curie.

Anche questo effetto è reversibile.

1.5.3 – Fotoacustica

Nella fotoacustica le onde sonore si generano eccitando il trasduttore tramite impulsi laser. Pertanto per realizzare trasduttori o rilevatori fotoacustici è necessario l'impiego di fibre ottiche. Le fibre, oltre a realizzare la guida d'onda per il segnale laser, fungono da vincolo per l'onda meccanica.

In questo tipo di sonde, solitamente, si rilevano i cambiamenti di spessore, causati da una sollecitazione acustica, in uno strato sottile di materiale che realizza un interferometro Fabry-Pérot ad un'estremità della fibra ottica. Ad esempio Beard e Mills usarono il polimetilmetacrilato (PMMA), polimero comunemente usato in elettronica, per realizzare una sonda fotoacustica [11].

Le sonde realizzate in fibra ottica hanno un'elevata risoluzione spaziale. La frequenza e l'ampiezza di banda dell'onda ultrasonora dipendono dalla durata dell'impulso laser.

1.5.4 – Materiali

I materiali utilizzati per realizzare trasduttori ultrasonici si possono dividere in due categorie: i materiali piezoelettrici naturali e i materiali resi piezoelettrici tramite polarizzazione. Nella prima classe rientrano cristalli quali ad esempio il quarzo, la tormalina, il niobato di litio (LiNbO_3), il tantalato di litio (LiTaO_3) e l'ossido di zinco (ZnO). I trasduttori realizzati con piezoelettrici naturali, solitamente, hanno delle emissioni a frequenze alte, maggiori di 6 MHz, e non hanno un'eccellente efficienza di trasformazione elettro-meccanica. Di contro il loro invecchiamento avviene a velocità inferiore agli altri materiali. A titolo di esempio, nel 2010 Kotopoulis et al. pubblicarono un lavoro [12] in cui realizzarono diversi trasduttori home made in niobato di litio con frequenza di emissione pari a 6,6 MHz dimostrando come le caratteristiche piezoelettriche di tale materiale siano ottime a temperatura ambiente ma peggiorino all'aumentare della temperatura.

I materiali piezoelettrici in seguito a polarizzazione sfruttano la proprietà ferroelettrica per produrre onde acustiche. Fra questi si possono distinguere:

- (a) I piezoceramici;
- (b) I piezocompositi;
- (c) I piezopolimeri.

Fra i materiali appartenenti alla prima categoria rientrano il titanato di bario (BaTiO_3), il titanato di piombo (PbTiO_3), il metaniobato di piombo (PbNb_2O_6) e il piombo-zirconato di titanio (PbZrO_3) comunemente abbreviato con l'acronimo PZT. Il PbNb_2O_6 è il materiale con le caratteristiche più promettenti della categoria, ma la difficoltà di produzione ne limita la diffusione [13]. Quello più utilizzato in ambito industriale per la realizzazione di trasduttori è invece il PZT.

I piezoceramici hanno efficienze di trasformazione elettro-meccanica più elevate rispetto ai piezoelettrici naturali; inoltre, avendo una buona lavorabilità e una vasta gamma di geometrie realizzabili, si prestano alla produzione in serie. Fra gli svantaggi si può considerare la depolarizzazione

causata dall'invecchiamento che diminuisce le prestazioni dei trasduttori piezoceramici. La depolarizzazione non è imputabile esclusivamente all'invecchiamento ma anche all'effetto piroelettrico. Tale fenomeno consta nell'aumento della temperatura del materiale a causa della differenza di potenziale applicata; l'aumento di temperatura accelera la depolarizzazione.

I materiali piezocompositi sono formati da una matrice polimerica in cui vengono immersi degli elementi piezoceramici. Tali materiali presentano una sensibilità ed una larghezza di banda maggiori rispetto ai piezoceramici e l'impedenza acustica più bassa comporta un miglioramento dell'efficienza.

Infine, i piezopolimeri, vengono utilizzati principalmente per generare alte frequenze; si possono ottenere onde acustiche con frequenze dall'ordine dei kHz a quello dei GHz, dato che i piezoceramici risultano troppo fragili per questa applicazione. I piezopolimeri più comunemente impiegati sono il polivinilidenfluoruro (PVdF) e il copolimero di trifluoroetilene (TrFE). Lo svantaggio principale dei piezopolimeri risiede nella relativamente bassa efficienza elettro-meccanica.

1.6 – Campo emesso da un trasduttore

Per semplicità, consideriamo un trasduttore piano circolare di raggio a . Si voglia determinare l'ampiezza del campo acustico in ogni punto del mezzo in cui si propaga. I punti sono posizionati ad una distanza R dal centro del trasduttore e sfasati di un angolo θ rispetto all'asse di simmetria z , vedi Fig.7.

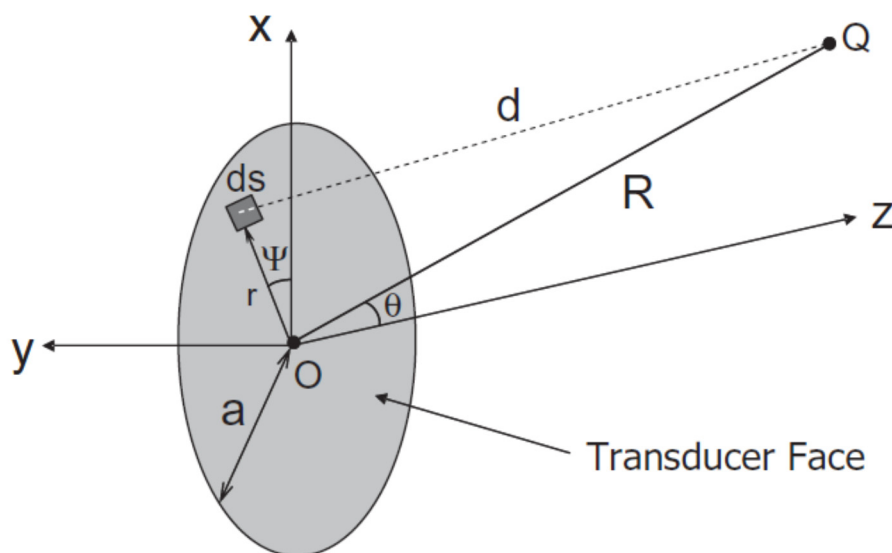


Fig. 7 Riferimenti per il campo emesso da un trasduttore piano circolare [14]

Il campo può essere calcolato utilizzando il principio di Huygens; si può assumere che la superficie del trasduttore sia composta da un numero enorme di superfici infinitesime di area ds . Ogni elemento infinitesimo è posizionato ad una distanza r dal centro e con un angolo ψ rispetto all'asse x ed emetterà un'onda di pressione data dalla formula per sorgenti puntiformi:

$$p(d) = A_0 \cdot \frac{e^{j(\omega t - kd)}}{d} ds \quad (1.32)$$

dove A_0 è una costante e rappresenta un'ampiezza di riferimento relativa ad una distanza r_0 .

A causa delle diverse distanze che le onde emesse da ogni elemento di superficie devono percorrere per raggiungere il punto in cui si vuole calcolare il campo, ogni onda avrà una fase differente. Ciò dà vita a fenomeni di interferenza costruttiva e distruttiva.

Per semplificare ulteriormente il caso consideriamo il modello di pistone piano, cioè tutti gli elementi infinitesimi si muovono sulla superficie del trasduttore con la stessa fase.

Per calcolare la pressione del campo in un punto $Q(R, \theta)$ del mezzo bisogna integrare i contributi di tutti gli elementi infinitesimi che formano la superficie. Se si considera trascurabile l'attenuazione del mezzo si ottiene:

$$p = A_0 \int_{r=0}^a \int_0^{2\pi} \frac{e^{j(\omega t - kd)}}{d} \cdot r d\psi dr \quad (1.33)$$

1.6.1 – Near field e far field

E' interessante restringere l'analisi all'intensità del campo acustico lungo l'asse di simmetria z . Una relazione che permette tale analisi è fornita da Beyer e Letcher [15]:

$$\frac{I}{I_0} = \sin^2 \left\{ \frac{\pi}{\lambda} \left[(a^2 + z^2)^{\frac{1}{2}} - z \right] \right\} \quad (1.34)$$

con I e I_0 rispettivamente le intensità nel punto a distanza z e sulla superficie del trasduttore.

Nella Fig.8b è mostrato l'andamento dell'intensità normalizzata in funzione di $\lambda z/a^2$. Osservando il grafico si può notare come in prossimità della superficie del trasduttore l'intensità vari velocemente con una periodicità non lineare alternando una serie di massimi e minimi. I punti di massimo si hanno quando la funzione seno assume valori pari a ± 1 ; le distanze per cui questa condizione è soddisfatta valgono:

$$z_{max} = \frac{4a^2 - \lambda^2(2m + 1)^2}{4\lambda(2m + 1)} \quad m = 0, 1, 2, \dots \quad (1.35)$$

Al contrario, i punti di minimo si hanno quando la funzione seno assume il valore 0; le distanze per cui l'intensità normalizzata assume valore minimo sono:

$$z_{min} = \frac{a^2 - \lambda^2 n^2}{2n\lambda} \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (1.36)$$

L'ultimo valore di z per cui il rapporto I/I_0 ha un massimo viene chiamato fuoco naturale, Z_{NF} .

$$Z_{NF} = \frac{4a^2 - \lambda^2}{4\lambda} \quad (1.37)$$

Nel caso in cui sia soddisfatta la condizione $a^2 \gg \lambda^2$, questa può essere approssimata a:

$$Z_{NF} = \frac{a^2}{\lambda} \quad (1.38)$$

Fino al fuoco naturale l'intensità del campo lungo l'asse di simmetria varia rapidamente e anche la distribuzione sul piano xy , mostrata nella Fig.8c, presenta dei lobi laterali variabili. Solitamente quest'area non viene sfruttata proprio per queste sue caratteristiche. Questa regione prende il nome di

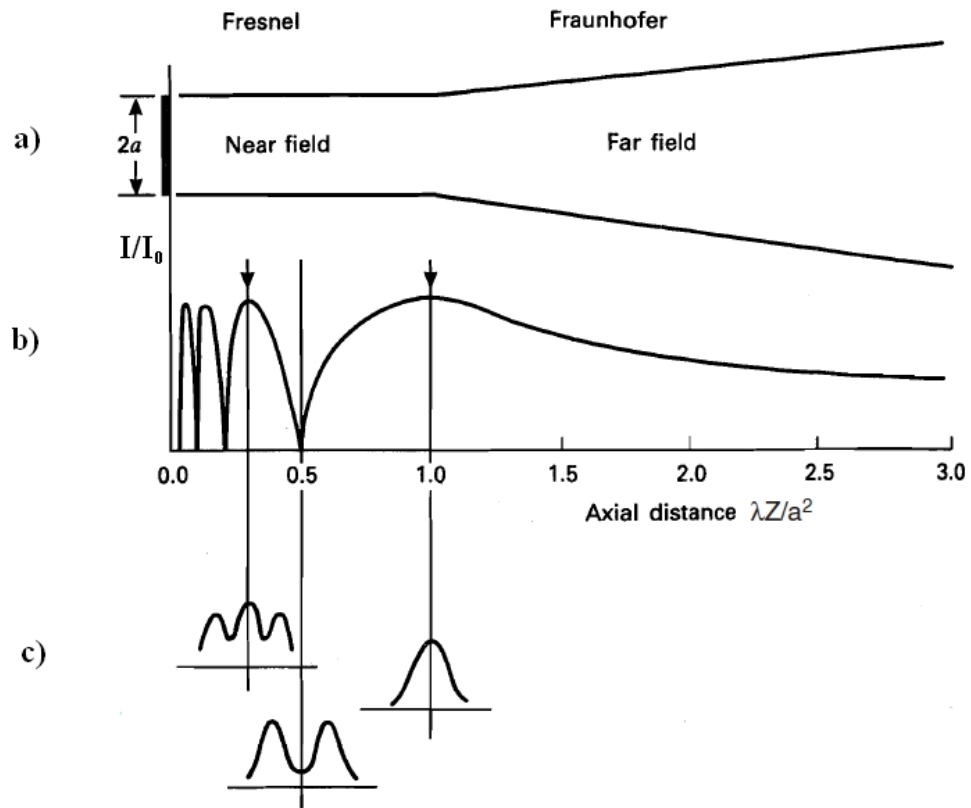


Fig. 8 a) zone del campo emesso da un trasduttore piano circolare; b) grafico dell'intensità normalizzata emessa dal trasduttore lungo l'asse acustico del trasduttore; c) distribuzione trasversale dell'intensità [1]

campo prossimo, near field, o zona di Fresnel. Dopo il fuoco naturale il campo diventa più uniforme e decade monotonamente; questa regione prende il nome di campo lontano, far field, o zona di Fraunhofer.

Nel near field il fascio si propaga come un'onda piana, con delle piccole aberrazioni periferiche dovute all'effetto di bordo; quindi, come mostrato in Fig.8a, inizialmente il fascio assume una forma cilindrica. Quando supera il fuoco naturale si propaga come un'onda sferica con centro nel centro del trasduttore; nel far field il fascio assume una forma troncoconica divergente. L'angolo β con cui diverge il fascio dipende dalla lunghezza d'onda nel mezzo, e quindi dalla frequenza dell'onda emessa, e dalla geometria del trasduttore.

$$\beta = \sin^{-1} \left(\frac{0,61\lambda}{a} \right) \quad (1.39)$$

Per ottenere un angolo di divergenza piccolo, a parità di raggio del trasduttore, è necessario aumentare la frequenza acustica emessa. La frequenza influenza anche la posizione del fuoco naturale; in particolare aumentando la frequenza aumenta la distanza del fuoco naturale dalla superficie del trasduttore. Infine, la frequenza è legata anche all'attenuazione dell'onda nei tessuti. Le onde che riescono a penetrare più a fondo nei tessuti sono quelle a bassa frequenza. Per tale motivo, in applicazioni mediche, è necessario trovare un giusto compromesso fra la divergenza del fascio e la distanza di penetrazione.

1.7 – Trasduttore focalizzato

Per trasduttore focalizzato s'intende un trasduttore a singolo elemento in cui la lamina vibrante è sagomata in modo da concentrare l'energia in un'area limitata chiamata fuoco. La focalizzazione può realizzarsi su di una linea, in questo caso si parla di lente cilindrica, oppure su di un punto, si parla allora di lenti sferiche.

I parametri caratteristici di un trasduttore focalizzato saranno presentati nei prossimi paragrafi.

1.7.1 – Distanza focale F

Si indica con F la distanza fra la superficie del trasduttore ed il punto focale espressa in millimetri d'acqua. Se consideriamo, ad esempio, una lente sferica, la distanza focale è legata al raggio della lente R dalla relazione:

$$F = R \cdot \frac{n}{n - 1} \quad (1.40)$$

dove n è l'indice di rifrazione del materiale piezoelettrico con cui è realizzato il trasduttore:

$$n = \frac{c_{trasd}}{c_{acqua}} \quad (1.41)$$

Quando l'onda acustica non si propaga in acqua è necessario utilizzare una formula diversa per ricavare la distanza focale effettiva. Supponendo, come di solito avviene, che l'onda attraversi uno strato d'acqua di spessore d o di una sostanza gelatinosa con caratteristiche acustiche molto simili a quelle dell'acqua prima di raggiungere il mezzo in cui deve propagarsi, la distanza focale effettiva è:

$$F_{eff} = \left[(F_{acqua} - d) \cdot \frac{c_{acqua}}{c_{mezzo}} \right] + d \quad (1.42)$$

1.7.2 – Coefficiente di focalizzazione f

Il coefficiente di focalizzazione, anche chiamato f number, è il rapporto fra la distanza focale F e la distanza del fuoco naturale Z_{NF} , introdotta nel *par.1.6.1*. Tanto più piccolo è il valore di f tanto più il fascio sarà focalizzato. Il massimo valore che può assumere il coefficiente di focalizzazione è 1; in questo caso la distanza focale e la distanza del fuoco naturale coincidono, non è presente nessuna focalizzazione.

1.7.3 – Dimensioni focali

Quando si lavora con trasduttori focalizzati non si considera il punto focale bensì un volume, tipicamente a forma di ellissoide, in cui l'intensità è maggiore della soglia a -6 dB rispetto al massimo. Si definiscono la profondità focale l , la lunghezza della zona focale lungo la direzione dell'asse acustico, e l'apertura focale m_f , la lunghezza della zona focale in una direzione perpendicolare all'asse acustico.

In acqua la profondità focale è data dalla seguente relazione:

$$l = 4\lambda \frac{F^2}{D^2} \quad (1.43)$$

dove D è il diametro del trasduttore. Se la focalizzazione avviene in un mezzo diverso dall'acqua bisogna considerare la profondità effettiva:

$$l_{eff} = l \frac{c_{acqua}}{c_{mezzo}} \quad (1.44)$$

L'espressione dell'apertura focale è unica sia che l'onda si propaghi in acqua che in un mezzo diverso:

$$m_f = \lambda \frac{F}{D} \quad (1.45)$$

1.8 – Struttura del trasduttore

La struttura tipica di un trasduttore piano a singolo elemento è mostrata in Fig.9. Nella figura sono messi in evidenza le parti di cui è costituito.

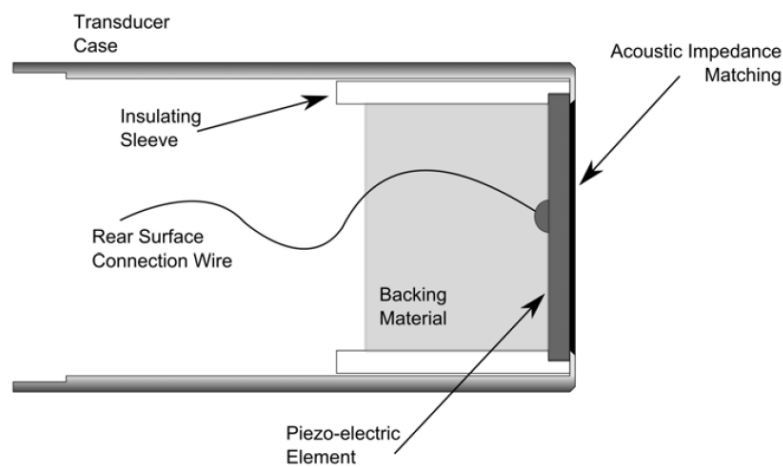


Fig. 9 Struttura fisica di un trasduttore US con componenti evidenziati

Il case è la struttura esterna del trasduttore, cioè un supporto rigido che racchiude tutti i componenti. Solitamente presenta un connettore per collegare le metallizzazioni sull'elemento attivo ad un circuito di pilotaggio esterno. Esistono diversi materiali che possono essere utilizzati per realizzare il case, sia metallici che plastici. A seconda delle applicazioni può essere necessario immergere totalmente in acqua il trasduttore; in tali condizioni il case deve essere waterproof.

L'isolante serve a proteggere l'elemento attivo e il backing material; spesso è realizzato con una resina epossidica.

L'elemento attivo è una lamina realizzata con uno dei materiali di cui si è discusso nel *par.1.5.4*. La lamina vibra a causa della tensione applicata alle sue facce ed emette l'onda acustica. Lo spessore della lamina è legata alla frequenza emessa; in particolare, lo spessore è pari a metà della lunghezza d'onda relativa al centro banda del trasduttore. In tal modo le onde riflesse dalla facce esterne interferiscono costruttivamente con quelle interne alla lamina in risonanza.

Il backing material è una sostanza ad alta attenuazione ultrasonica ed alta densità che smorza le oscillazioni dell'elemento attivo. La sua presenza aumenta la banda degli ultrasuoni emessi a discapito

della potenza acustica e protegge la lamina vibrante dalla rottura meccanica conseguente a vibrazioni troppo ampie.

Tra l'elemento attivo e il mezzo in cui si propagherà l'onda è inserito un layer di matching. Tale strato, oltre a proteggere la lamina vibrante dall'ambiente esterno, serve a massimizzare il coefficiente di trasferimento fra il piezoelettrico e il mezzo, come già discusso nel *par.1.4.2*. Lo spessore è pari ad un quarto della lunghezza d'onda relativa al centro banda del trasduttore; le onde riflesse all'interfaccia layer di matching-ambiente esterno devono riattraversare tale strato e quindi sull'elemento attivo hanno uno sfasamento di $\lambda/2$. Ciò assicura l'impossibilità di interferenze costruttive che potrebbero danneggiare il trasduttore.

1.9 – Trasduttori phased array

Quando è necessario modificare notevolmente le caratteristiche di un fascio ultrasonoro utilizzando un unico trasduttore non è più possibile utilizzare un singolo elemento attivo. Prendendo ad esempio un trasduttore a singolo elemento focalizzato, variando la frequenza dell'onda emessa all'interno della banda del trasduttore possiamo leggermente modificare la distanza focale e le dimensioni focali, ma il fuoco rimarrà sempre sull'asse acustico.

I trasduttori phased array permettono di modificare il fronte d'onda del fascio acustico, di variare la distanza focale e di effettuare uno steering del fuoco, cioè spostare il fuoco lungo una direzione perpendicolare a quella di propagazione del fascio.

Nei phased array si hanno più lamine vibranti di piccole dimensioni pilotabili separatamente o a gruppi. Variando la fase dei segnali delle lamine si hanno interferenze diverse che producono fronti d'onda differenti.

Esistono due categorie di trasduttori phased array: i flat array, in cui gli elementi sono disposti tutti su un piano, e i pre-focalizzati, in cui gli elementi sono disposti su una superficie semisferica o semicilindrica.

Nei flat array gli elementi si possono disporre in maniera più o meno ordinata per creare una matrice bidimensionale, oppure si possono considerare elementi aventi una dimensione uguale e affiancarli gli uni agli altri per creare quello che viene chiamato linear array. Due esempi di come le fasi dei segnali pilota possano influenzare il fronte d'onda sono mostrati in Fig.10.

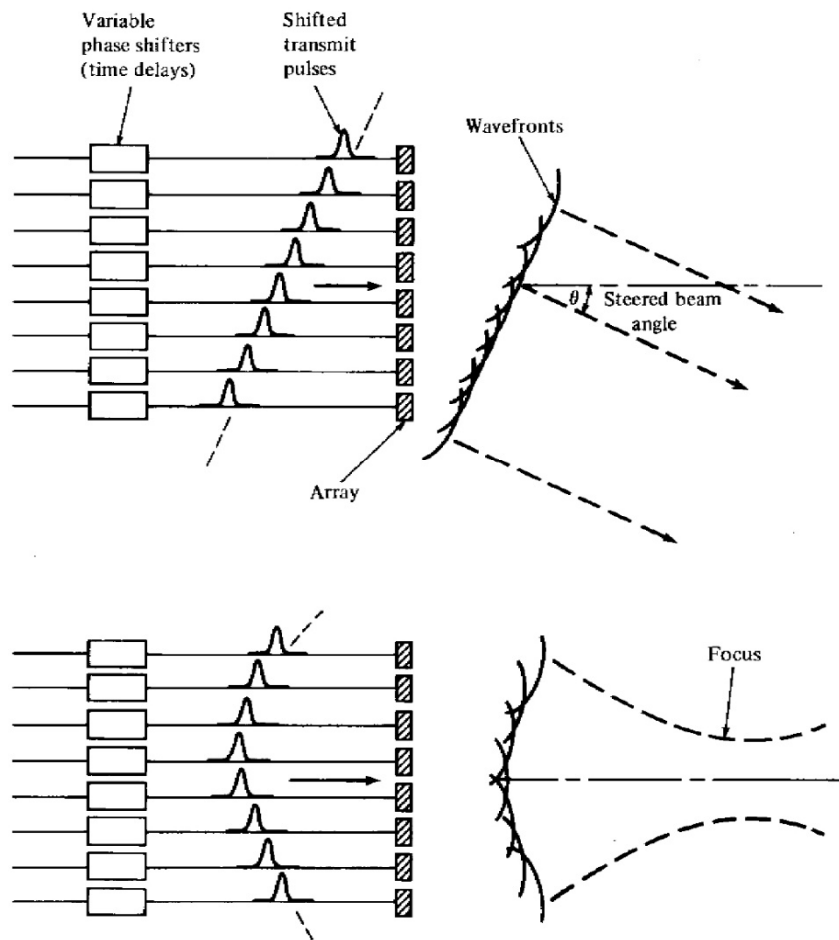


Fig. 10 Illustrazione di come la scelta delle fasi dei segnali applicati agli elementi di un phased array possa modificare il fronte d'onda del fascio acustico totale

Fra i phased array pre-focalizzati quelli più comuni sono quelli anulari, in cui gli elementi sono disposti su una superficie sferica e formano degli anelli concentrici di raggio differente, e quelli random, in cui gli elementi non hanno un pattern periodico e sono posizionati in maniera quasi casuale. Due studi di Ebbini [16] [17] mostrano come una struttura simmetrica crei delle interferenze costruttive in dei punti, e come il numero e la posizione di tali punti cambino in dipendenza dalla struttura, mentre ciò non avviene in un phased array quasi-random.

Usando i phased array è possibile intervenire sul fronte d'onda del fascio acustico in modo da eliminare l'effetto di defocalizzazione e aberrazione causato dal passaggio attraverso tessuti con diverse proprietà acustiche prima di giungere al target. Un ottimo metodo per rilevare come l'onda viene rifratta e scatterata durante il passaggio dei tessuti è il time reversal method (TRM), elaborato da Fink [18] [19] [20]. Il TRM consta di tre passaggi consecutivi:

1. Si eccita un solo elemento dell'array per generare un'onda sferica; il fronte di tale onda subirà delle alterazioni dovute ai tessuti intermedi. Il target deve essere un forte riflettore acustico,

- ad esempio un calcolo renale, un agente di contrasto, una sorgente fotoacustica o delle microbolle create dalla cavitazione. Il target creerà un'eco con fronti d'onda sferici;
2. Il phased array è utilizzato come ricevitore per rilevare l'eco, che sarà alterata in maniera duale all'onda inviata nel primo passaggio;
 3. L'analisi dell'onda rilevata permette di calcolare le fasi da assegnare ad ogni elemento per focalizzare il fascio acustico sul target tenendo conto delle aberrazioni.

I tre step sono schematizzati graficamente nella Fig.11

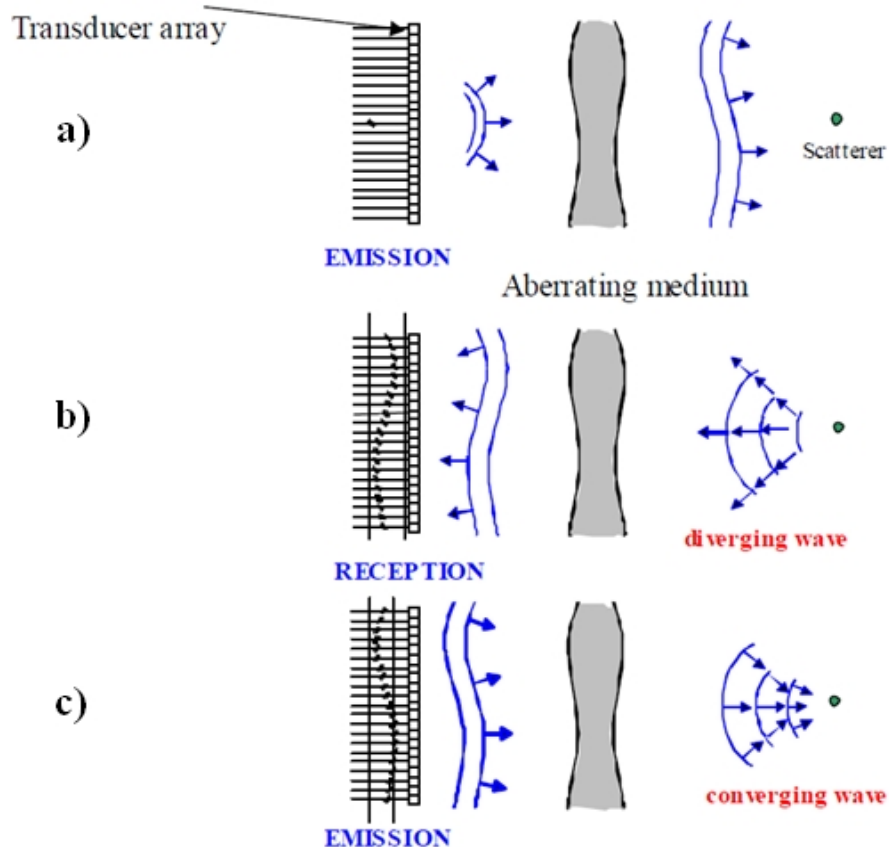


Fig. 11 Fasi del time reversal method; a) emissione da un solo elemento di un fronte d'onda sferico e aberrazione; b) rilevazione dell'eco causata dal riflettore acustico; c) adattamento delle fasi per contrastare l'aberrazione e focalizzare l'onda sul target [18]

1.10 – Idrofoni

Gli idrofoni sono dei particolari rilevatori di onde acustiche adatti all'utilizzo in acqua. In questi dispositivi si utilizza l'effetto piezoelettrico diretto per produrre una tensione quando il cristallo è sottoposto ad una sollecitazione meccanica. In linea teorica qualsiasi trasduttore piezoelettrico è capace sia di emettere che di rilevare onde acustiche, ma le tecniche di realizzazione esaltano solo una delle due azioni a discapito dell'altra. A titolo di esempio, nell'imaging ecografico si sfrutta l'eco generata dai tessuti per ricostruire la composizione e la struttura dei tessuti interni. All'interno di una sonda di un comune apparecchio ecografico si distinguono due componenti: un trasduttore, solitamente anulare, che

emette il fascio acustico e un rilevatore, che si posiziona nello spazio vuoto al centro del trasduttore, per raccogliere l'eco.

Esistono diverse tipologie di idrofoni a seconda delle applicazioni. Gli idrofoni a membrana sfruttano le vibrazioni indotte su un anello di materiale piezoelettrico per la rilevazione dell'onda di pressione. Tali idrofoni si posizionano perpendicolarmente alla direzione di propagazione del fascio e quindi non sono indicati per l'utilizzo in spazi ristretti o se è necessaria una buona accuratezza spaziale. Una tipologia di idrofoni che permette di fare analisi spaziali accurate è costituita dagli idrofoni needle. Tali strumenti usano per la rilevazione una sottile lamina di materiale piezoelettrico disposta parallelamente alla direzione di propagazione dell'onda di pressione. La lamina è comunemente realizzata in PVdF e il suo spessore varia fra 9 μm e poche decine di micron. Lo spessore del PVdF influenza la sensitivity dell'idrofono al variare della frequenza. Gli idrofoni a multielemento si posizionano perpendicolarmente alla direzione di propagazione degli ultrasuoni ma mantengono la risoluzione spaziale grazie alla suddivisione della sua superficie in elementi più piccoli che funzionano come idrofoni singoli.

Infine, gli idrofoni a fibra ottica non utilizzano un materiale piezoelettrico poiché sfruttano l'effetto fotoacustico. Come riferito nel *par.1.5.3*, tale categoria d'idrofoni rileva i cambiamenti di spessore, dovuti alla pressione esercitata dall'onda acustica, in un interferometro Fabry-Pérot posto sull'estremità della fibra ottica. Il costo medio di questi ultimi è relativamente più alto rispetto agli altri ma si ottengono risoluzioni spaziali elevatissime. Inoltre Morris et al. [21] hanno dimostrato che è possibile realizzare un'unica sonda per la rilevazione contemporanea di pressione e temperatura.

Bibliografia

- [1] Preston, R. C. (Ed.). (2012). Output measurements for medical ultrasound. Springer Science & Business Media.
- [2] Morse, P. M., & Ingard, K. U. (1968). Theoretical acoustics. Princeton university press.
- [3] Hill, C. R., Bamber, J. C., & ter Haar, G. (Eds.). (2004). Physical principles of medical ultrasonics (Vol. 2). Chichester, UK:: John Wiley & Sons.
- [4] Duck, F. A. (2013). Physical properties of tissues: a comprehensive reference book. Academic press.
- [5] Duck, F. A. (2000). Propagation of sound through tissue. The Safe Use of Ultrasound in Medical Diagnosis, edited by G. Haar and FA Duck (British Institute of Radiology, London, 2000), 4-15.
- [6] Bacon, D. R. (1988). Primary calibration of ultrasonic hydrophone using optical interferometry. Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, IEEE Transactions on, 35(2), 152-161.
- [7] Wells, P. N. T. (1977). Biomedical ultrasonics. Academic Pr.
- [8] Zeqiri, B. (1989). Reference liquid for ultrasonic attenuation. Ultrasonics, 27(5), 314-315.
- [9] Kaye, G. W. C., & Laby, T. H. (1921). Tables of Physical & Chemical Constants. National Physical Laboratory.
- [10] Kinsler, L. E., Frey, A. R., Coppens, A. B., & Sanders, J. V. (1999). Fundamentals of acoustics. Fundamentals of Acoustics, 4th Edition, by Lawrence E. Kinsler, Austin R. Frey, Alan B. Coppens, James V. Sanders, pp. 560. ISBN 0-471-84789-5. Wiley-VCH, December 1999., 1.
- [11] Beard, P. C., & Mills, T. N. (1996). Extrinsic optical-fiber ultrasound sensor using a thin polymer film as a low-finesse Fabry–Perot interferometer. Applied optics, 35(4), 663-675.
- [12] Kotopoulis, S., Wang, H., Cochran, S., & Postema, M. (2010, October). Lithium niobate ultrasound transducers for high-resolution focused ultrasound surgery. In Ultrasonics Symposium (IUS), 2010 IEEE (pp. 72-75). IEEE.
- [13] Li, Y. M., Cheng, L., Gu, X. Y., Zhang, Y. P., & Liao, R. H. (2008). Piezoelectric and dielectric properties of PbNb₂O₆-based piezoelectric ceramics with high Curie temperature. journal of materials processing technology, 197(1), 170-173.
- [14] Azhari, H. (2010). Basics of biomedical ultrasound for engineers. John Wiley & Sons.
- [15] Beyer, R. T., & Letcher, S. V. (1969). Physical ultrasonics (Vol. 32). Academic Press.
- [16] Ebbini, E. S., & Cain, C. (1991). A spherical-section ultrasound phased array applicator for deep localized hyperthermia. Biomedical Engineering, IEEE Transactions on, 38(7), 634-643.

- [17]Ebbini, E. S., & Cain, C. (1989). Multiple-focus ultrasound phased-array pattern synthesis: optimal driving-signal distributions for hyperthermia. *Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, IEEE Transactions on, 36(5), 540-548.
- [18]Fink, M. (1992). Time reversal of ultrasonic fields. I. Basic principles. *Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, IEEE Transactions on, 39(5), 555-566.
- [19]Wu, F., Thomas, J. L., & Fink, M. (1992). Time reversal of ultrasonic fields. II. Experimental results. *Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, IEEE Transactions on, 39(5), 567-578.
- [20]Cassereau, D., & Fink, M. (1992). Time-reversal of ultrasonic fields. III. Theory of the closed time-reversal cavity. *Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, IEEE Transactions on, 39(5), 579-592.
- [21]Morris, P., Hurrell, A., Shaw, A., Zhang, E., & Beard, P. (2009). A Fabry–Pérot fiber-optic ultrasonic hydrophone for the simultaneous measurement of temperature and acoustic pressure. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 125(6), 3611-3622.

CAPITOLO II – Set-up per trial preclinici su piccoli animali

L'uso di ultrasuoni in campo medico è oggetto di studio e sperimentazione sin dagli anni '40 [1], ma nelle ultime due decadi i passi avanti nei campi dell'imaging e delle tecniche di costruzione e pilotaggio dei trasduttori hanno reso possibile l'affermarsi della tecnica MRgFUS (Magnetic Resonance guided Focused Ultrasound Surgery).

La MRgFUS, che verrà illustrata in dettaglio all'inizio di questo capitolo, è una tecnica che permette di intervenire su organi interni, provocando la necrosi dei tessuti, senza incisioni. Ciò implica minori tempi di ospedalizzazione e recupero dei pazienti sottoposti a tale trattamento.

Attualmente tale tecnica è utilizzata su pazienti per i trattamenti di fibromi uterini, carcinomi alle mammelle e metastasi ossee [2][3][4][5][6]. Altre applicazioni sono in fase di sperimentazione, come ad esempio il trattamento su tumori al fegato [7][8], al pancreas [8] e alla prostata [9]. Negli ultimissimi anni si è cominciato a sperimentare l'utilizzo degli ultrasuoni focalizzati (FUS) anche sul cervello [10]; le applicazioni in questo ambito sono, tra le altre, il trattamento di tremori parkinsoniani [11][12] e la temporanea apertura delle barriere ematoencefaliche (blood brain barrier BBB) [13][14].

I campi di applicazione clinica della MRgFUS sono limitati dalle autorizzazioni ricevute. Per ottenere tali autorizzazioni sono necessari studi preclinici approfonditi che dimostrino l'effettiva efficacia del trattamento. In questo ambito si è scelto di integrare un sistema HIFU (High Intensity Focused Ultrasound) e una risonanza magnetica per uso animale da 7 Tesla per creare un set-up innovativo e ad alta risoluzione per la ricerca preclinica in vivo.

2.1 – Risonanza magnetica: principi di funzionamento

La tecnica di imaging MR (Magnetic Resonance) si basa sul fenomeno dell'assorbimento di radiazioni da parte di nuclei di atomi con caratteristiche particolari, immersi in un forte campo magnetico. La radiazione emessa da un trasmettitore che opera nel campo della radiofrequenza (RF), verrà parzialmente assorbita dal campione e rilevata da un'antenna ricevente.

L'atomo normalmente utilizzato come campione è l'idrogeno; la scelta è dettata dall'abbondanza di tale elemento nei tessuti e da alcune sue proprietà che facilitano la rilevazione dei segnali MR. Un nucleo d'idrogeno può essere assimilato ad una sfera carica che ruota attorno ad un asse e che possiede un momento magnetico intrinseco μ . Se sottoposto ad un campo magnetico costante B_0 , μ tenderà ad allinearsi al campo magnetico in maniera parallela o antiparallela a seconda dello spin posseduto. Tale allineamento avverrà tramite un moto di precessione attorno alla direzione di B_0 con una frequenza di precessione f_0 , chiamata frequenza di Larmor. Tale frequenza è dipendente dall'elemento che costituisce

il campione ed è comunque direttamente proporzionale all'intensità del campo magnetico statico applicato.

Il sistema in riposo può essere perturbato da un secondo campo magnetico B_1 , ortogonale a B_0 e variabile nel tempo, creato da un'onda a radiofrequenza. Se B_1 ruota attorno a B_0 con frequenza pari a quella di precessione dell'atomo d'idrogeno si crea un fenomeno di risonanza. B_0 e B_1 sono chiamati rispettivamente campo di polarizzazione e campo di eccitazione.

Quando la perturbazione dovuta all'onda a radiofrequenza termina si ristabilisce l'equilibrio fra il momento magnetico e il campo di polarizzazione. Il processo che riporta il sistema in equilibrio avviene con determinate modalità temporali e prende il nome di "rilassamento".

Si possono distinguere due fenomeni di rilassamento rispetto alla direzione di B_0 , un rilassamento longitudinale ed uno trasversale, Fig.12. Nel primo fenomeno si ha un recupero della componente del momento magnetico nella direzione del campo di polarizzazione; questo recupero avverrà con un andamento esponenziale con costante di tempo T_1 . Il rilassamento trasversale al contrario registrerà una diminuzione della componente trasversale, a causa del riallineamento con il campo di polarizzazione. Anche questo fenomeno ha un andamento esponenziale, decrescente stavolta, con costante di tempo T_2 .

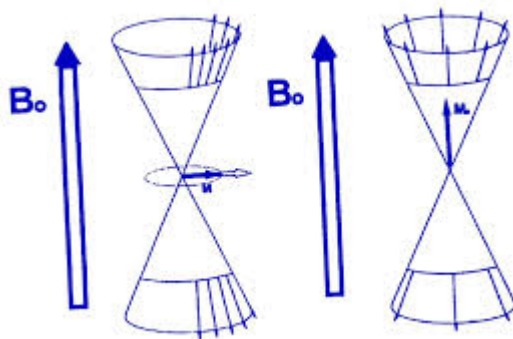


Fig. 12 Componente trasversale e longitudinale del momento magnetico

In realtà, la MR non studia l'andamento di un solo atomo ma di un volume campione contenente un numero variabile di atomi d'idrogeno a seconda della sua composizione. Quindi non si considera il singolo momento magnetico μ ma la somma vettoriale di tutti i momenti magnetici di tutti gli atomi nel volume che costituiscono il vettore magnetizzazione M .

Il segnale prodotto dalla variazione nel tempo del vettore M , durante la fase di rilassamento seguente all'eccitazione, viene misurato in laboratorio usando una bobina ad induzione elettromagnetica, che si comporta quindi come un'antenna, posta attorno al campione in direzione ortogonale al campo esterno.

Si possono progettare opportune ripetizioni di segnali di eccitazione in modo da enfatizzare nel segnale letto solo una delle caratteristiche del campione, tra cui T_1 , T_2 e densità. Le ripetizioni dei segnali di eccitazione prendono il nome di sequenze.

Al fine di ottenere un'immagine è necessario avere anche informazioni spaziali per ricostruire i dati in forma matriciale; tali informazioni si ottengono modificando il campo di polarizzazione. Se B_0 non è costante ma ha un gradiente lungo una direzione, campioni posti in punti diversi avranno una frequenza di precessione diversa. In tal modo lo spettro del segnale rilevato dalla bobina avrà diverse componenti spettrali che daranno informazioni su volumi posti in punti diversi.

Il gradiente del campo magnetico si ottiene sovrapponendo al campo di polarizzazione un campo di entità minore variabile linearmente nel volume.

2.2 – MRgFUS

La tecnica MRgFUS ha lo scopo di innalzare la temperatura dei tessuti da trattare al di sopra di 65°C provocandone la necrosi coagulativa; si parla in questi casi di termoablazione. L'innalzamento di temperatura è causato da un fascio acustico fortemente focalizzato; la focalizzazione permette di avere un'intensità molto elevata solo in un volume limitato, il fuoco. Al di fuori della zona focale l'intensità acustica è così bassa da non provocare danni nei tessuti attraversati.

Le lesioni indotte sono caratterizzate da lisi cellulare con formazione di cavità; quindi l'effetto del trattamento è equivalente a quello di un'asportazione chirurgica, ma senza necessità di interventi invasivi quali l'utilizzo di aghi o bisturi.

L'imaging MR è necessaria per:

- Pianificare il trattamento, cioè raccogliere informazioni morfologiche per individuare la lesione patologica da trattare, decidere la modalità e la sequenza di sonicazione, verificare che il percorso del fascio non incontri sacche di gas, come quelle contenute nelle anse intestinali, ossa e tessuti sensibili al calore, come le terminazioni nervose;
- Monitorare il trattamento, cioè controllare in tempo reale la temperatura del tessuto in fase di sonicazione per verificare che il fuoco sia posizionato correttamente nella zona pianificata e che il calore generato non danneggi i tessuti sani circostanti;
- Verificare l'esito del trattamento, cioè verificare attraverso immagini morfologiche l'avvenuta necrosi della lesione patologica immediatamente dopo il trattamento.

La fase di controllo durante la sonicazione è la più importante perché si verifica che le ipotesi di aberrazione del fascio calcolate con le immagini di pianificazione sono corrette ed il fuoco reale coincide con quello pianificato; inoltre si controlla che non avvengano fenomeni cavitativi (formazione di microbolle di gas) che causano una produzione e una diffusione del calore incontrollata. Il fenomeno della cavitazione sarà affrontato più in dettaglio nel capitolo V.

Il controllo si effettua tramite il thermal mapping, cioè creando con lo strumento di risonanza delle immagini che diano informazioni sulla temperatura invece che sulla natura dei tessuti. Per ricavare tali immagini si possono usare diverse tecniche [15]. La prima consiste nel fare una sequenza MR pesata in T_1 [16][17]. Il tempo di rilassamento longitudinale dipende dalla temperatura a cui si trova il campione, prendendo un riferimento "freddo", cioè ricavando un'immagine in T_1 dei tessuti prima della sonicazione, è possibile calcolare la temperatura come differenza; si assume che nell'immagine di riferimento i tessuti siano alla temperatura corporea di 37°C. Un secondo metodo valuta la distanza di diffusione delle molecole d'acqua [16][18]. Come il T_1 anche la diffusione è temperatura dipendente, in

particolare più alta è la temperatura maggiore è la diffusione, e quindi si può ricavare una mappa termica per differenza da un riferimento. Entrambe le tecniche appena discusse hanno lo svantaggio di essere tessuto dipendente, cioè dipendono dalla composizione del tessuto e quindi dalla quantità di atomi di idrogeno o molecole d'acqua contenute nel campione. Una tecnica di imaging che non ha questo svantaggio è quella pesata in fase [10][19][20]. La fase dipende dalla frequenza di precessione del nucleo di riferimento e tale frequenza è temperatura dipendente.

Un sistema MRgFUS consta quindi di due componenti principali: un macchinario per risonanza magnetica ed un sistema ad ultrasuoni focalizzati. Quest'ultimo, solitamente, è costituito da un lettino, che si sostituisce al lettino per il paziente del macchinario MR, che contiene il trasduttore, l'eventuale sistema di movimentazione del trasduttore e l'elettronica necessaria alla creazione e modulazione dei segnali pilotanti. Il trasduttore varia a seconda dell'applicazione e del costruttore. Nei sistemi ExAblate dell'InSightec (Haifa, Israele), con cui ho lavorato durante il periodo di dottorato, il trasduttore per i fibromi uterini è un phased array bowl shaped immerso in una vasca contenente acqua degassata o olio di ricino, a seconda della potenza della risonanza; in tale sistema è anche prevista la movimentazione del trasduttore, che deve essere ottenuta mediante motori idraulici o piezoelettrici per limitare l'uso di materiali magnetici all'interno dello strumento MR. I moduli per il trattamento di metastasi ossee o prostata, invece, utilizzano dei trasduttori phased array planari. Questi non sono immersi in una vasca ma sono inseriti all'interno di balloon plastici usa e getta riempiti di acqua degassata.

La compatibilità magnetica è una necessità per un sistema MRgFUS. Materiali magnetici inseriti all'interno, o posti nelle vicinanze, di uno strumento MR, oltre a subire una forza dovuta al campo magnetico che potrebbe danneggiarli o ostacolarne il funzionamento, possono causare delle disuniformità nel campo magnetico introducendo degli artefatti nelle immagini ottenute. Ove possibile, tutti i componenti che contengano materiali magnetici o possano risentire delle onde a radiofrequenza vengono inseriti all'interno di gabbie di Faraday in alluminio.

2.3 – Componenti del set-up per esperimenti in vivo

Il set-up per esperimenti in vivo realizzato è posizionato presso i locali del Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche e Forensi (DIBIMEF) del Policlinico di Palermo dati in comodato d'uso alla Promedica Bioelectronics srl. Il set-up è costituito da una risonanza magnetica preclinica da 7 Tesla prodotto dalla Bruker (Ettlingen, Germania) e da un modulo FUS Exablate2100 dell'InSightec. Le apparecchiature originali MR e FUS sono state messe a disposizione, nell'ambito del progetto PON01-01059, rispettivamente dall'Università di Palermo e dalla Promedica Bioelectronics.

Nel dettaglio, il sistema FUS è un modulo per il trattamento della prostata modificato secondo le esigenze del set-up. Lo scopo è integrare i due strumenti per farli operare insieme. L'alta risoluzione del

sistema MR permetterà studi più approfonditi sugli effetti biologici degli ultrasuoni su modelli animali rispetto a quelli ottenibili con una risonanza con un campo più basso.

2.3.1 – Sistema MR BioSpec 70/30

Il macchinario per risonanza magnetica è un modello BioSpec 70/30 della Bruker. Usando tale strumento è possibile ricavare delle immagini con una risoluzione submillimetrica, di molto superiore a quella ottenibile con i macchinari clinici, che nei casi migliori non è inferiore ad un millimetro. Ciò è possibile grazie alla generazione di un campo di polarizzazione di 7 Tesla che è notevolmente più alto di quelli comunemente usati nella diagnostica umana; valori comuni per le risonanze cliniche sono 1 T e 1,5 T, in generale comunque non superiori a 3 T.

La struttura esterna di un sistema MR ha la forma di un cilindro cavo; lo spazio interno, dove viene posizionato il paziente, o il campione da analizzare, prende il nome di bore. La risonanza Bruker in oggetto ha un diametro del bore di 300 mm. Questo spazio non è tutto a disposizione del campione, infatti deve essere inserita almeno una bobina, sempre di forma cilindrica cava e coassiale alla struttura esterna, per la ricezione e/o per la trasmissione degli impulsi a radiofrequenza. Nello specifico, per integrare i sistemi MR e FUS si è scelto di utilizzare una bobina che opera sia in ricezione che in trasmissione e che riduce lo spazio a disposizione a 86 mm di diametro. Tale scelta è un compromesso fra il rapporto segnale rumore ottenibile e lo spazio necessario ad ospitare il trasduttore US e il modello animale.

Il gradiente del campo, che come spiegato nel paragrafo precedente è necessario per avere una discriminante spaziale, è di 200 mT/m.

Il sistema è anche fornito di un sistema automatico per il posizionamento del campione all'interno del bore, l'AutoPac. Questo sistema permette di posizionare in modo preciso il campione al centro del campo magnetico; è fornito di un lettino plastico per alloggiare l'animale e prevede delle cavità in cui può circolare il gas anestetico per mantenere sedata la cavia.

2.3.2 – Sistema ExAblate 2100 prostate module

Il modulo per la prostata del sistema ExAblate è dotato di un trasduttore phased array flat rettangolare da 1000 elementi con frequenza centrale pari a 2,5 MHz. Il sistema genera un numero finito di segnali di pilotaggio ognuno con una fase differente; ad ogni elemento può essere inviato ciascuno di questi segnali. La scelta delle fasi da assegnare ad ogni elemento influenza le caratteristiche del fascio acustico ottenuto; in particolare si possono modificare la distanza di focalizzazione, la dimensione focale ed inoltre è possibile fare uno steering elettronico del fascio, cioè muovere il fuoco in una direzione perpendicolare all'asse del trasduttore.

Il trasduttore viene inserito all'interno di un baloon plastico pieno d'acqua collegato ad un sistema di ricircolo che serve a dissipare il calore che si forma sulla faccia del trasduttore quando viene eccitato. Il sistema trasduttore-baloon è solidale ad un braccio meccanizzato che permette di muoverlo automaticamente.

Per imparare ad operare su questo strumento, e sul modulo per i fibromi uterini di cui si discuterà nel prossimo capitolo, sia a livello hardware che software ho partecipato ad un corso tenutosi dal 2 al 6 novembre 2014 ad Haifa (Israele), presso la sede dell'InSightec, ottenendo un certificato di field engineer.

2.4 – Craddle FUS

Il craddle è la parte scorrevole del lettino del sistema FUS che entra all'interno della risonanza magnetica. La parte di sistema che si occupa della generazione dei segnali di pilotaggio del trasduttore, della gestione dei motori e del ricircolo dell'acqua è solidale al lettino e quindi separata dal craddle. In quest'ultimo sono presenti il trasduttore, i motori piezoelettrici per la movimentazione con i relativi



Fig. 13 Craddle FUS modificato – vista posteriore



Fig. 13 Craddle FUS modificato – vista laterale

encoder e vari sensori. I moduli di uno stesso sistema si differenziano per il craddle, che può essere separato dal resto del lettino e sostituito con un altro modulo.

Non lavorando con gli spazi di una risonanza magnetica umana si è reso necessario modificare il craddle del sistema. Per prima cosa si è eliminato il sistema di movimento automatico, non necessario e impossibile da integrare in uno spazio talmente ridotto. In un secondo momento è stata rimossa tutta la parte di craddle dove normalmente si adagia il paziente; in questo modo è stato possibile avvicinare il più possibile il blocco con i connettori alla risonanza magnetica e poter sfruttare tutta la lunghezza del cavo che collega tale blocco al trasduttore per arrivare agevolmente a posizionare il trasduttore al centro del campo della risonanza magnetica. Il risultato di queste modifiche è mostrato in Fig.13 e Fig.14.

Anche il lettino del sistema AutoPac del sistema MR è stato oggetto di modifiche. I lettini standard per topi e ratti in nostro possesso non possedevano la profondità necessaria per alloggiare il trasduttore FUS inserito nel balloon pieno d'acqua e lasciare spazio per posizionare il modello animale, per cui è stato ridisegnato e realizzato un nuovo lettino che prevede anche un sistema di bloccaggio per il corpo della sonda contenente il trasduttore. Il lettino modificato è mostrato in Fig.15.

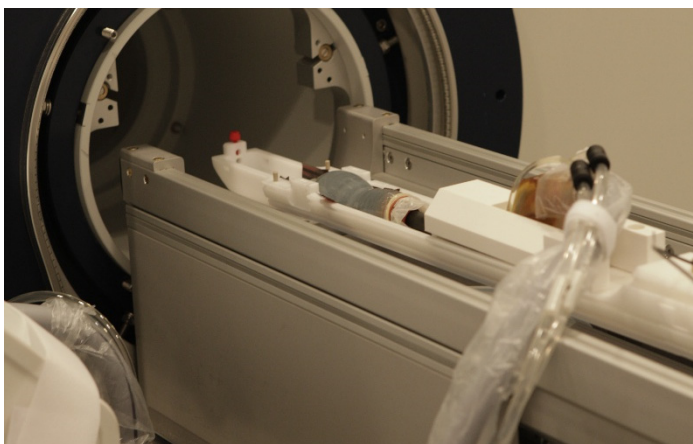


Fig. 14 Lettino AutoPac modificato per alloggiare la sonda FUS

2.5 – Interfacciamento FUS-MR

L'interfacciamento dello strumento FUS InSightec e della risonanza magnetica Bruker deve avvenire su due livelli: hardware e software. Quest'ultimo prevede la comunicazione delle due piattaforme di controllo degli strumenti. Il sistema MR possiede una working station di comando con un sistema operativo Linux release CentOS. E' possibile operare sullo strumento FUS con una GUI proprietaria e attraverso una serie di file .ini presenti che girano su un pc con Windows XP.

Non tratterò oltre l'aspetto dell'interfacciamento software fra i due diversi sistemi operativi e dello sviluppo di un'applicazione per inviare i comandi in rete alle due macchine. Il mio ruolo è di supporto all'ingegnere del software che sta tuttora lavorando su questo task grazie alla mia conoscenza della GUI del sistema FUS.

Il mio compito principale nell'interfacciamento fra i due sistemi ha riguardato l'aspetto hardware. In un primo momento sono stati individuati i segnali necessari al funzionamento in accordo dei due sistemi. La base di lavoro per questa ricerca è stato il sistema ExAblate; tale strumento nasce per cooperare con una risonanza magnetica clinica ed è quindi progettato per comunicazioni hardware con un sistema MR.

Eliminando fra i vari collegamenti che normalmente si realizzano quelli che sono stati ritenuti superflui, o perché usati in particolari applicazioni che non saranno oggetto di sperimentazione o perché non più utili in seguito alle modifiche subite dal craddle, sono stati individuati quelli necessari e si è cercato di trovare dei segnali di input/output del sistema MR che potessero adattarsi alle specifiche.

I segnali necessari, con nomenclatura concorde ai manuali InSightec, sono risultati essere soltanto due:

1. Non-sampling output: un segnale in uscita dalla risonanza magnetica che è attivo quando il sistema non sta acquisendo immagini. Questo segnale ha uno scopo duale; in primo luogo, se è in atto un'acquisizione il sistema FUS inibisce alcune attività che potrebbero causare disturbi agli impulsi RF, e quindi degradare l'immagine ottenuta. Il secondo scopo è quello di proteggere alcuni componenti del sistema FUS, come i motori ed alcuni encoder, che potrebbero danneggiarsi se attivati in presenza di segnali a radiofrequenza;
2. Trigger input: un ingresso per il sistema MR che serve a sincronizzare i due strumenti. L'acquisizione delle mappe termiche deve avvenire durante la sonicazione da parte del sistema FUS. In dettaglio, si devono acquisire diverse immagini termiche in modo da coprire un tempo precedente la sonicazione, per avere un riferimento "freddo", l'intero arco temporale del surriscaldamento dovuto alla sonicazione e parte del periodo successivo di raffreddamento per verificare la corretta decadenza della temperatura. L'inizio della sonicazione e dell'acquisizione MR devono essere quindi sincronizzate; a tale scopo si utilizza il segnale di trigger.

In entrambi i sistemi, FUS e MR, l'elettronica utilizza segnali di tipo TTL, quindi la compatibilità è assicurata. La risonanza magnetica, a differenza dell'ExAblate, lavora in logica negativa, quindi si è prestata particolare attenzione alla diversa interpretazione dei livelli logici dei segnali nei due sistemi.

2.5.1 – Non-sampling output

Il blocco di amplificatori a radiofrequenza dello strumento MR fornisce un'uscita che dà informazioni sullo stato degli amplificatori stessi; questo segnale è chiamato blanking.

Il blanking è a livello logico alto quando lo stadio degli amplificatori non è attivo e quindi non è possibile che siano inviati impulsi a radiofrequenza dalle bobine, è a livello logico basso quando lo stadio è attivo e quindi è possibile l'invio di impulsi per l'acquisizione.

E' da notare che il segnale di blanking non dà informazioni riguardanti l'effettivo invio degli impulsi RF da parte delle bobine della risonanza magnetica, ma solo sulla possibilità o impossibilità che ciò accada. Un esempio di segnale di blanking è mostrato in Fig.16, le forme d'onda sono state acquisite durante una sequenza localizer con tempo di ripetizione 33 ms con un oscilloscopio mod. DSOX3104A della Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).



Fig. 15 Segnale di blanking a) con T_r 33 ms e zoom b) degli impulsi negativi

Tale segnale si presta comunque allo scopo prefisso, ed è stato quindi utilizzato per l'interfacciamento hardware. Non si è reso necessario invertire il segnale, il non-sampling deve essere attivo, a livello logico alto in una logica positiva, quando la macchina MR non sta acquisendo; questa condizione coincide con l'impossibilità di inviare impulsi RF segnalata dall'inattività del blanking, che è anch'essa associata ad un livello logico alto.

2.5.2 – Trigger input

Il trigger è un segnale TTL attraverso cui il sistema FUS invia il comando di avvio della scansione alla risonanza magnetica. Il termine trigger in elettronica indica un segnale che provoca l'avvio di una serie di operazioni o cambiamenti di variabili quando assume una determinato stato alto o basso o ha un fronte di salita o discesa. Una volta avviate tali operazioni il valore assunto dal segnale di trigger non ha più importanza finché non si concludono e il sistema torna in attesa di un nuovo avvio. Per tale motivo, i segnali di trigger sono solitamente dei segnali impulsivi di durata dell'ordine delle decine o centinaia di ms. Se invece il prosieguo delle operazioni continua a dipendere dal valore assunto dal segnale di avvio e queste si mettono in pausa quando il segnale non ha più il corretto stato per riprendere in seguito al ritorno del segnale nello stato attivo allora non si parla di trigger ma di gating.

La risonanza Bruker prevede un input di trigger, sempre un segnale TTL ma attivo al livello basso, e all'interno del software presenta un trigger module per rendere la sequenza progettata "triggerata". Normalmente questo modulo viene utilizzato per sincronizzare l'acquisizione con un monitor di parametri vitali collegato alla cavia; in tal modo è possibile evitare artefatti da movimento dovuti, ad esempio, al ciclo di respirazione dell'animale o al battito cardiaco. Il sistema MR richiede, durante l'acquisizione, un evento di trigger per ogni passo di fase, cioè per ogni ripetizione dei segnali di eccitazione delle bobine RF. In una tipica sequenza si possono avere centinaia di passi di fase.

Considerando l'intera durata dell'acquisizione, che varia da pochi secondi a diversi minuti, il segnale richiesto dalla risonanza assomiglia maggiormente ad un gating che non ad un trigger.

Il sistema FUS fornisce un trigger propriamente detto, un impulso di circa 20 ms, per avviare la scansione, quindi i due segnali sono incompatibili dal punto di vista della durata. In linea teorica è possibile riscrivere la sequenza di impulsi RF in modo da rendere sensibile la risonanza ad un segnale di trigger ma ciò richiede una conoscenza approfondita del linguaggio di programmazione delle sequenze Bruker non in possesso del fisico responsabile della risonanza.

La soluzione ritenuta più semplice è stata inserire un circuito buffer fra i due sistemi lungo la linea del segnale di trigger. La versione finale della scheda progettata è mostrata in Fig.17.

Tale circuito ha in ingresso l'impulso proveniente dal sistema FUS e fornisce in uscita un segnale stabile di durata adeguata al completamento della scansione. Per ottenere ciò si è utilizzato un integrato NE555 in modalità multivibratore monostabile. In un primo circuito la durata del segnale in uscita poteva essere modificata agendo su un reostato. A partire dalla versione 2.0 del circuito il reostato è stato sostituito da un selettore a scatti, in modo da rendere più user-friendly la scelta della durata del segnale di uscita. I valori delle resistenze collegate ai vari pin del selettore sono stati scelti considerando che la durata dell'impulso in uscita è data dalla seguente relazione:

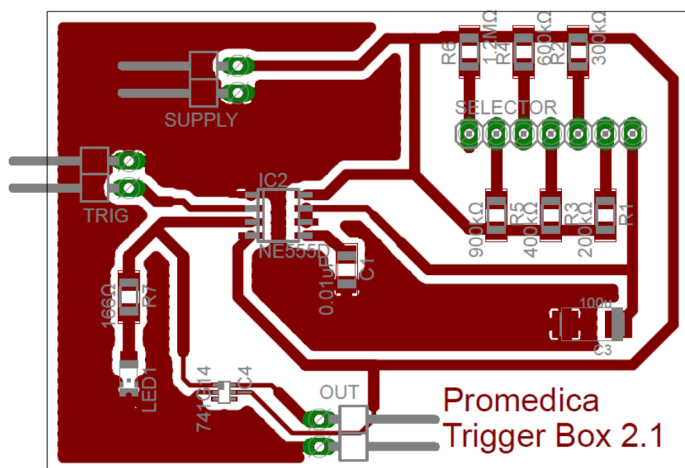


Fig. 16 Scheda buffer per l'adattamento dei tempi di trigger

completamento della scansione. Per ottenere ciò si è utilizzato un integrato NE555 in modalità multivibratore monostabile. In un primo circuito la durata del segnale in uscita poteva essere modificata agendo su un reostato. A partire dalla versione 2.0 del circuito il reostato è stato sostituito da un selettore a scatti, in modo da rendere più user-friendly la scelta della durata del segnale di uscita. I valori delle resistenze collegate ai vari pin del selettore sono stati scelti considerando che la durata dell'impulso in uscita è data dalla seguente relazione:

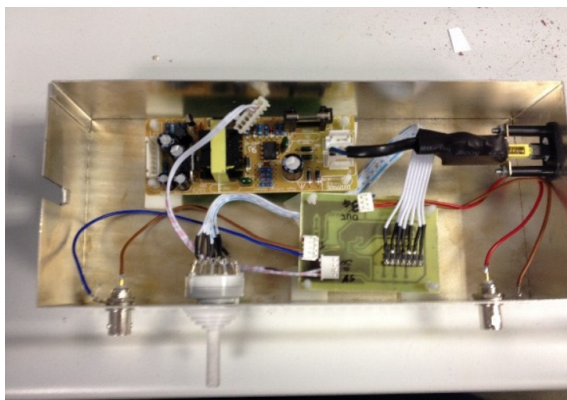
$$t \cong R \cdot C \quad (2.1)$$

dove la capacità è comune a tutti i resistori ed ha un valore di 100 μ F.

Agendo sul selettore si possono ottenere impulsi di durata compresa fra un minimo di 25 secondi ed un massimo di 2 minuti e 25 secondi. Un inverter SN74LVC2G14 provvede a negare il segnale fornendo un'uscita compatibile con la logica TTL negativa del sistema Bruker.

Il circuito è stato realizzato esponendo una scheda di rame monofaccia con uno strato di positive photoresist a raggi ultravioletti mediante un bromografo mod. AZ 210 della Mega Electronics (Cambridge, UK) a disposizione nel laboratorio elettro-acustico dei locali Promedica. La scheda in seguito all'esposizione è stata sviluppata in una soluzione di idrossido di sodio (NaOH) e poi incisa immergendola in un'altra soluzione contenente percloruro ferrico (FeCl_3).

Dopo la saldatura dei componenti, il circuito stampato è stato inserito, insieme all'alimentatore, in una scatola di alluminio in cui si sono innestati i plug BNC e il selettore a scatti. Lo strumento completo è mostrato in Fig.18.



a)



b)

Fig. 17 Circuito per l'adattamento dei tempi di trigger a) vista interna b) box chiuso

Tutti i test fatti per verificare il funzionamento della scheda hanno dato esito positivo. Impostando la sequenza triggerata nel sistema MR è possibile avviarla e portarla a termine tramite un impulso di circa 20 ms scegliendo il corretto posizionamento del selettore.

2.6 – Risultati

2.6.1 – Allineamento piani

La pianificazione del trattamento FUS avviene su immagini morfologiche MR. Le coordinate di targeting ottenute saranno ovviamente riferite ad un sistema di assi cartesiani tridimensionali relativo al sistema MR. Gli assi di riferimento del sistema FUS, invece, hanno l'origine nel centro della lamina vibrante del trasduttore, che giace sul piano xy, con l'asse z ortogonale al piano del trasduttore stesso.

Per sonicare nel punto pianificato occorre impostare nel software FUS le corrette coordinate focali nel giusto riferimento. E' necessario, quindi, determinare la matrice di trasferimento fra i due sistemi di riferimento. Per una corretta trasformazione delle coordinate bisogna considerare sia la traslazione che la rotazione del sistema di riferimento.

Sono stati condotti, e sono tuttora in corso, dei test per automatizzare la procedura di trasformazione del sistema di riferimento. In particolare, si è notato come in tutti i test effettuati gli assi z e i piani xy dei due sistemi fossero paralleli. Si è allora cercato di introdurre un disallineamento dei piani agendo sul lettino AutoPac della risonanza. In fase di introduzione del lettino nel bore, a causa dello spazio ridotto, è necessario effettuare una serie di aggiustamenti in modo da non toccare le pareti della bobina RF. In tutti i test effettuati questi aggiustamenti hanno causato un riallineamento dei piani xy. Inoltre, la

sonda contenente il trasduttore è bloccata saldamente al lettino da una staffa plastica che ne vieta la rotazione. Per tale motivo non può essere introdotto un disallineamento dei piani ruotando il trasduttore.

Da queste considerazioni e dall'analisi dei risultati ottenuti si è dedotto che in realtà la matrice di trasformazione delle coordinate dovrà considerare solo un fenomeno di traslazione degli assi e non di rotazione, rendendo più semplice la sua determinazione. Il lavoro di riconoscimento automatico della posizione del trasduttore e di calcolo della matrice di trasformazione è tuttora in corso.

In Fig.19 si possono vedere due serie di acquisizioni di sonicazioni su un fantoccio di idrogel per diversi valori di coordinata z distanti 3 mm; la serie a) è riferita ad un'acquisizione normale, quella b) ad una con un tentativo di disallineamento indotto.

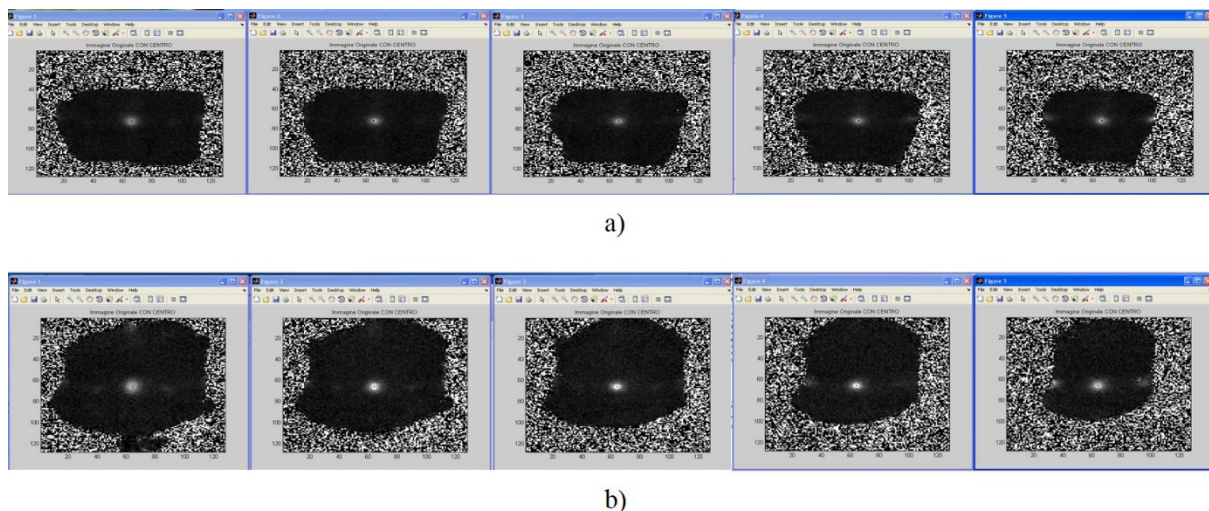


Fig. 18 Immagini coronali MR di fantocci di idrogel distanti 3 mm; serie a) acquisizione normale; serie b) acquisizione con tentativo di disallineamento indotto

2.6.2 – Steering

Non avendo a disposizione un sistema motorizzato per muovere o ruotare il trasduttore al di sotto del campione deve essere possibile effettuare uno steering elettronico del fuoco per variane la posizione. Ovviamente tale spostamento sarà limitato nello spazio, ma essendo il sistema progettato per lavorare su piccoli animali può essere sufficiente per intercettare diverse zone di interesse.

Sono stati condotti numerosi test per calcolare gli angoli di steering. Data la forma rettangolare del trasduttore si è inizialmente ipotizzato che tali angoli fossero diversi a seconda della direzione. In accordo con il sistema di riferimento FUS il trasduttore giace sul piano $z = 0$, l'asse x coincide con i lati minori del rettangolo e l'asse y con quelli maggiori.

I test hanno confermato l'ipotesi fatta; per avere una qualità di focalizzazione accettabile non si possono superare angoli di steering di 5° e 10° rispettivamente nelle direzioni x e y.

La Fig.20 si riferisce ad un test effettuato acquisendo la mappa termica su un piano coronale del sistema MR, che coincide con il piano del trasduttore nel sistema FUS, a 30 mm dal trasduttore; si rilevano spostamenti, relativi alla posizione centrale mostrata nella Fig.20a, simmetrici lungo i due assi x e y rispettivamente di $\pm 2,6$ mm e $\pm 5,2$ mm.

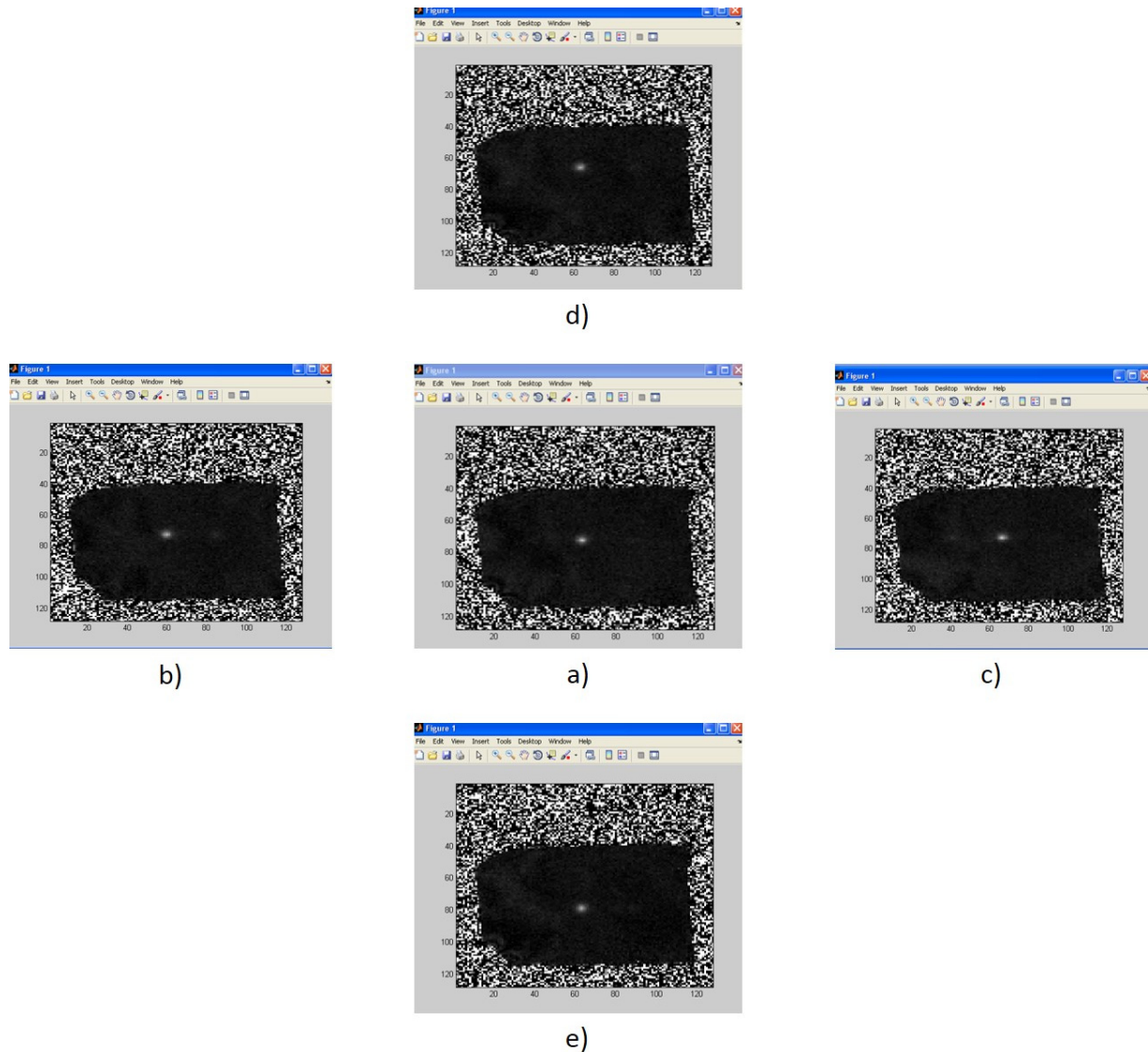


Fig. 19 Acquisizioni del test di steering; a) immagine di riferimento; b) steering -2,6 mm lungo l'asse x; c) steering +2,6 mm lungo l'asse x; d) steering +5,2 mm lungo l'asse y; e) steering -5,2 mm lungo l'asse y.

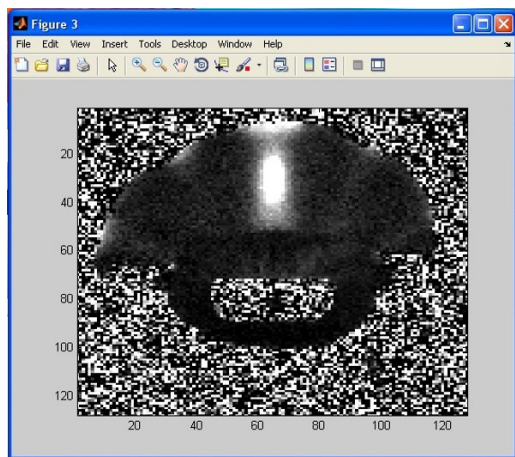
2.6.3 – Dimensioni focali

Tutti i test e le rilevazioni degli incrementi di temperatura ricavati dalle mappe termiche sono stati effettuati usando come bersaglio un gel che simula le caratteristiche acustiche dei tessuti. Tale fantoccio ci è stato fornito dall'InSightec ed è usato per il quality assessment delle prestazioni dei sistemi ExAblate. A causa dell'opacità e della natura del gel non è possibile effettuare un'ispezione visiva post-

sonicazione per verificare che la regione in cui si registra l'aumento di temperatura tramite il sistema MR sia effettivamente presente e con uguali dimensioni nel campione.

Per avere un riscontro visivo della focalizzazione del fascio ultrasonico sono stati eseguiti degli esperimenti usando come target non il gel ma tessuti animali ex vivo. Nel dettaglio si sono utilizzati campioni di tessuti di bovino, quali cervello e fegato, e di pollo per avere riscontro con tessuti di natura diversa.

In tutti i casi le dimensioni della lesione indotta sul tessuto sono coincise con quelle rilevate tramite le immagini termiche MR. A titolo di esempio, in Fig.21 sono mostrate l'immagine termica e l'effetto sul tessuto dopo una sezione in seguito ad una sonicazione di 25 s ad una potenza acustica di 67 W.



a)



b)

Fig. 20 a) acquisizione immagine termica e b) effetto reale sul tessuto campione in seguito all'esposizione per 25 s ad un fascio acustico focalizzato con frequenza 2,5 MHz da 67 W emesso dal trasduttore del modulo prostate FUS

Bibliografia

- [1] Lynn, J. G., Zwemer, R. L., & Chick, A. J. (1942). The biological application of focused ultrasonic waves. *Science*, 96(2483), 119-120.
- [2] Cline, H. E., Hynynen, K., Watkins, R. D., Adams, W. J., Schenck, J. F., Ettinger, R. H., ... & Jolesz, F. A. (1995). Focused US system for MR imaging-guided tumor ablation. *Radiology*, 194(3), 731-737.
- [3] Cline, H. E., Schenck, J. F., Watkins, R. D., Hynynen, K., & Jolesz, F. A. (1993). Magnetic resonance-guided thermal surgery. *Magnetic resonance in medicine*, 30(1), 98-106.
- [4] Cline, H. E., Schenck, J. F., Hynynen, K., Watkins, R. D., Souza, S. P., & Jolesz, F. A. (1992). MR-guided focused ultrasound surgery. *Journal of computer assisted tomography*, 16(6), 956-965.
- [5] Hynynen, K., Damianou, C., Darkazanli, A., Unger, E., & Schenck, J. F. (1993). The feasibility of using MRI to monitor and guide noninvasive ultrasound surgery. *Ultrasound in medicine & biology*, 19(1), 91-92.
- [6] Hynynen, K., Darkazanli, A., Unger, E., & Schenck, J. F. (1993). MRI-guided noninvasive ultrasound surgery. *Medical physics*, 20(1), 107-115.
- [7] Fischer, K., Gedroyc, W., & Jolesz, F. A. (2010). Focused ultrasound as a local therapy for liver cancer. *The Cancer Journal*, 16(2), 118-124.
- [8] Anzidei, M., Napoli, A., Sandolo, F., Marincola, B. C., Di Martino, M., Berloco, P., ... & Catalano, C. (2014). Magnetic resonance-guided focused ultrasound ablation in abdominal moving organs: a feasibility study in selected cases of pancreatic and liver cancer. *Cardiovascular and interventional radiology*, 37(6), 1611-1617.
- [9] Zini, C., Hipp, E., Thomas, S., Napoli, A., Catalano, C., & Oto, A. (2012). Ultrasound-and MR-guided focused ultrasound surgery for prostate cancer. *World journal of radiology*, 4(6), 247.
- [10] Larrat, B., Pernot, M., Aubry, J. F., Dervishi, E., Sinkus, R., Seilhean, D., ... & Tanter, M. (2010). MR-guided transcranial brain HIFU in small animal models. *Physics in medicine and biology*, 55(2), 365.
- [11] Ahmed, H., Field, W., Hayes, M. T., Lopez, W. O. C., McDannold, N., Mukundan, S., & Tierney, T. S. (2015). Evolution of Movement Disorders Surgery Leading to Contemporary Focused Ultrasound Therapy for Tremor. *Magnetic resonance imaging clinics of North America*, 23(4), 515-522.
- [12] Schlesinger, I., Eran, A., Sinai, A., Eriq, I., Nassar, M., Goldsher, D., & Zaaroor, M. (2015). MRI Guided Focused Ultrasound Thalamotomy for Moderate-to-Severe Tremor in Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*, Volume 2015, Article ID 219149, 4 pages.

- [13]Hynynen, K., McDannold, N., Clement, G., Jolesz, F. A., Zadicario, E., Killiany, R., ... & Rosen, D. (2006). Pre-clinical testing of a phased array ultrasound system for MRI-guided noninvasive surgery of the brain—a primate study. *European journal of radiology*, 59(2), 149-156.
- [14]McDannold, N., Moss, M., Killiany, R., Rosene, D. L., King, R. L., Jolesz, F. A., & Hynynen, K. (2003). MRI-guided focused ultrasound surgery in the brain: Tests in a primate model. *Magnetic resonance in medicine*, 49(6), 1188-1191.
- [15]Rieke, V., & Butts Pauly, K. (2008). MR thermometry. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 27(2), 376-390.
- [16]Pilatou, M. C., Stewart, E. A., Maier, S. E., Fennessy, F. M., Hynynen, K., Tempany, C., & McDannold, N. (2009). MRI-based thermal dosimetry and diffusion-weighted imaging of MRI-guided focused ultrasound thermal ablation of uterine fibroids. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 29(2), 404-411.
- [17]Parker, D. L., Smith, V., Sheldon, P., Crooks, L. E., & Fussell, L. (1983). Temperature distribution measurements in two-dimensional NMR imaging. *Medical physics*, 10(3), 321-325.
- [18]Le Bihan, D., Delannoy, J., & Levin, R. L. (1989). Temperature mapping with MR imaging of molecular diffusion: application to hyperthermia. *Radiology*, 171(3), 853-857.
- [19]Li, Z., Vogel, M., Maccarini, P. F., Stakhursky, V., Soher, B. J., Craciunescu, O. I., ... & Stauffer, P. R. (2011). Improved hyperthermia treatment control using SAR/temperature simulation and PRFS magnetic resonance thermal imaging. *International Journal of Hyperthermia*, 27(1), 86-99.
- [20]Poorter, J. D. (1995). Noninvasive MRI thermometry with the proton resonance frequency method: study of susceptibility effects. *Magnetic Resonance in Medicine*, 34(3), 359-367.

CAPITOLO III – Evoluzione del set-up per esperimenti cellulari con sistema MRgFUS clinico

Durante il primo periodo di sperimentazione su cellule si è pensato di usare uno strumento clinico, il modulo per fibromi uterini (UF) ExAblate 2100 in possesso del DIBIMEF del Policlinico di Palermo, per testare l'effetto biologico degli ultrasuoni. Molto lavoro e tempo è stato speso sia da me che dai ricercatori con cui ho collaborato per trovare gli accorgimenti giusti, sia sul set-up fisico che a livello software, per adattare un sistema prettamente clinico ad un uso sperimentale in vitro.

In questo capitolo non tratterò i risultati ottenuti sui campioni cellulari perché non di mia competenza, ma illustrerò le considerazioni, le misure e le simulazioni software che hanno permesso di ottenere un set-up robusto.

3.1 – Sistema MRgFUS clinico

Il dispositivo MRgFUS installato nei locali di risonanza magnetica dell'istituto di scienze radiologiche dell'Università degli Studi di Palermo è costituito da un sistema MR Signa della General Electric (Fairfield, CT, USA) da 1,5 Tesla e un modulo UF ExAblate 2100.

Il sistema FUS è dotato di un trasduttore phased array bowl shaped con 208 elementi e frequenza centrale 1,15 MHz inserito all'interno di un alloggiamento riempito di acqua degassata ricavato nel lettino. La parte superiore, verso il paziente, dell'alloggiamento è chiusa da un materiale plastico semitrasparente con caratteristiche acustiche tali da minimizzare la riflessione degli ultrasuoni. Un sistema robotizzato permette di muovere il trasduttore in cinque direzioni distinte, tre lineari e due angolari. In questo modo è possibile modificare la posizione del fuoco sia tramite il sistema di motori che mediante steering elettronico. La distanza e la dimensione focale possono essere variate elettronicamente, durante l'algoritmo di assegnazione della fasi ai vari elementi del trasduttore.

La gestione del sistema è affidata ad un software proprietario di uso clinico. Tale software permette:

- L'importazione delle immagini di risonanza;
- La pianificazione del trattamento, cioè scegliere la posizione del fuoco, le sue dimensioni, il numero di sonicazioni da effettuare, l'energia acustica e la durata delle sonicazioni;
- La verifica del trattamento, il software comanda il sistema MR in modo da generare una serie di immagini di temperatura durante la sonicazione per verificare il corretto dosaggio degli

ultrasuoni, inoltre fornisce informazioni circa l'entità della riflessione e degli eventuali effetti cavitativi.

Ovviamente adattare un sistema progettato per uso umano per eseguire esperimenti in vitro ha richiesto un notevole numero di test e quindi di tempo ma alla fine si è riusciti ad ottenere un buon risultato.

3.2 – Riflessione e trasmissione multiwell

Come supporto per i campioni cellulari si è scelto di usare delle piastre di comune utilizzo biologico, denominate multiwell. Tali supporti sono piastre realizzate in polistirene, una termoplastica con buone caratteristiche termiche ed un basso coefficiente di assorbimento delle onde acustiche, 0,01-0,02 [1], in cui sono ricavati un numero variabile di pozzetti, well.

Le dimensioni delle piastre si modificano di poco cambiando il numero di well contenute, le variazioni sono mediamente inferiori ad un millimetro, ne consegue che il volume dei pozzetti diminuisce all'aumentarne del numero. In commercio è possibile trovare multiwell contenenti al più 1536 pozzetti, anche se quelle di uso più comune sono quelle da 6, 12, 24 e 96.

Per considerazioni circa i volumi da trattare, il numero di cellule utilizzate e il numero di replicati per ogni esperimento i biologi con cui ho collaborato hanno deciso di usare multiwell da 24.

Anche se il coefficiente di assorbimento del polistirene è basso si è scelto di effettuare delle misure preliminari per verificare che la plastica non provocasse aberrazioni o interferenze nell'onda acustica.

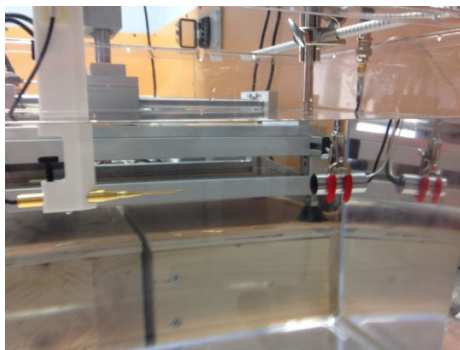
Per rilevare la pressione del campo acustico emesso in un punto si è utilizzato un sistema composto da un idrofono needle con punta da 1 mm e un preamplificatore da immersione con un guadagno di 8 dB a 3.5 MHz e una banda a -3 dB da 10 kHz a 50 MHz della precision acoustics ltd (pa) (Dorchester, UK); la punta e il preamplificatore sono mostrati in Fig.22. La sensibilità massima degli idrofoni needle si ha quando la punta è parallela alla direzione di propagazione del fascio e decresce velocemente



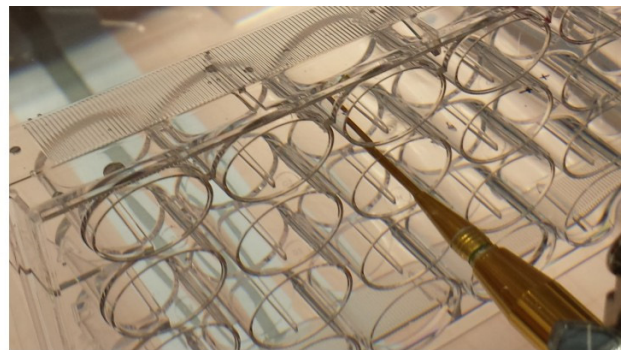
Fig. 21 Idrofono needle; punta da 1 mm e preamplificatore

all'aumentare dell'angolo di disallineamento. Il segnale in uscita dall'idrofono è stato inviato all'oscilloscopio DSOX3104A per la lettura.

Per rilevare le aberrazioni e l'attenuazione si è posto un trasduttore ad ultrasuoni flat con diametro dell'elemento attivo di 12 mm all'interno di una vasca piena d'acqua degassata. Inizialmente si sono misurate le pressioni emesse dal trasduttore lungo il suo asse acustico a diverse distanze posizionando e muovendo l'idrofono con un sistema 3D di stepper motor con passo minimo di 25 μm . In un secondo momento si è posizionata una multiwell con il fondo perpendicolare alla direzione di propagazione dell'onda acustica e si sono ripetute le misure alle stesse distanze. I due set-up sono mostrati in Fig.23.



a)



b)

Fig. 22 Set-up misura trasmissione multiwell; a) rilevazione di riferimento senza piastra; b) particolare delle misure con piastra

I risultati del test hanno mostrato come la differenza fra le intensità dell'onda acustica non superi il 6% e che, come ipotizzabile, i valori rilevati con la piastra siano in genere inferiori a quelli rilevati in campo libero. In Fig.24 è riportato il grafico dell'intensità normalizzata I/I_0 , dove con I_0 si intende l'intensità in campo libero e con I quella in presenza della piastra, in funzione della distanza dalla superficie del trasduttore; il rettangolo verde indica l'area in cui è stata inserita la multiwell.

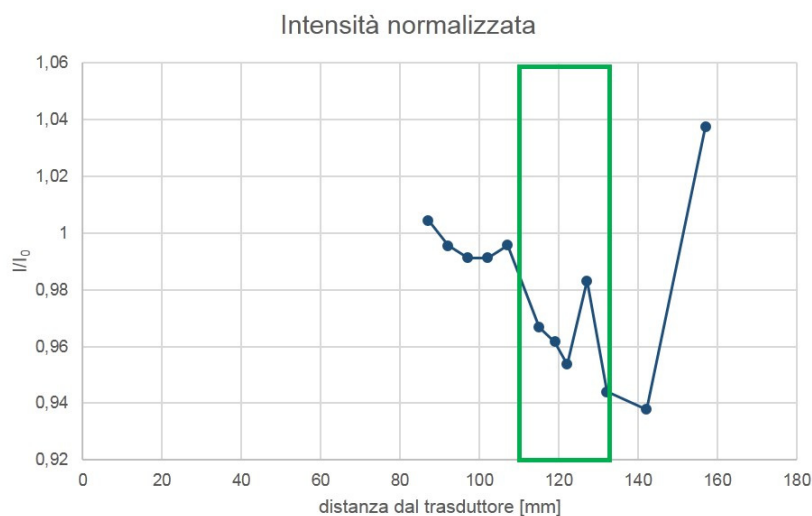


Fig. 23 Intensità normalizzata vs distanza dal trasduttore

3.3 – Procedura sperimentale

Per sonicare i campioni cellulari contenuti nelle multiwell il set-up generale consisteva nel posizionare al di sopra della vasca contenente il trasduttore un gelpad accoppiato acusticamente alla parte superiore della vasca versando un sottile strato d'acqua degassata e accertandosi che non si creassero bolle d'aria, che avrebbero causato riflessione dell'onda acustica. L'utilizzo di tale gelpad, con diversi spessori, è di normale uso anche nei trattamenti clinici e ha la doppia funzionalità di evitare la formazione di bolle d'aria fra superfici non parallele, come quelle della parte superiore rigida della vasca e la pelle umana, e di allontanare il target dal trasduttore per posizionarlo nella zona di massima escursione di steering elettronico. Sopra il gelpad veniva posta la multiwell.

Una volta effettuata la centratura e le prime scansioni MR si utilizzava il software FUS per procedere al trattamento. Il programma permette di pianificare le sonicazioni mostrando a video la zona focale e i due coni di propagazione dell'onda nel near field e nel far field. Dopo i primi test si è esclusa la possibilità di posizionare il fuoco sul volume campione; essendo tale sistema ideato per il trattamento clinico la potenza acustica nel fuoco risultava essere troppo elevata per esperimenti di tipo cellulare e, inoltre, l'intensità acustica all'interfaccia superiore campionaria creava una riflessione troppo elevata. Si è scelto, allora, di lavorare nel far field, zona in cui il campo è più omogeneo come spiegato nel *par.1.6.1*, e di posizionare il fuoco a circa 5 mm al di sotto del fondo del pozzetto. Quest'ultimo accorgimento è stato deciso per evitare che il cono di propagazione incontrasse gli angoli sul fondo della well che avrebbero potuto generare dei fenomeni di diffrazione non controllabile. Un particolare dell'interfaccia del software che mostra il posizionamento del fuoco è presentato in Fig.25. Dopo i settaggi iniziali si procedeva alla sonicazione dei pozzetti che contenevano campioni cellulari da trattare spostando di volta in volta il fuoco.

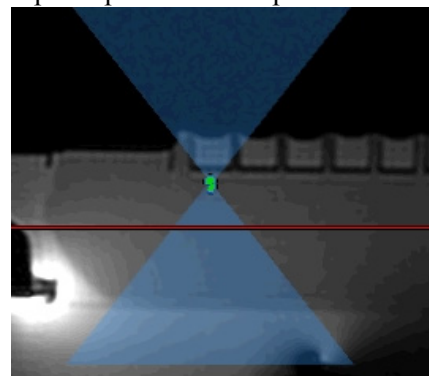


Fig. 24 Particolare dell'interfaccia software del sistema FUS

3.4 – Gelpad

Per il trattamento clinico con MRgFUS la InSightec fornisce un set che comprende anche un gelpad. Dato l'elevato costo di questo set, dopo i primi test si è deciso di realizzare in laboratorio un gelpad a basso costo.

In un primo periodo si sono realizzati in laboratorio dei gelpad di agar. L'agar è una sostanza gelatinosa derivata da un polimero polisaccaride, l'agarosio. E' utilizzato in svariati campi, tra cui la microbiologia, come mezzo di crescita di microorganismi, la culinaria, per realizzare gelatine commestibili, e la radiologia, per produrre fantocci per l'imaging.

In seguito l'agar è stato sostituito da un altro polimero polisaccaride di utilizzo comune in microbiologia, il gelrite. Con questo secondo materiale è stato possibile ottenere gelpad con una migliore conservazione nel tempo e meno fragili alla manipolazione rispetto a quelli ottenuti con agar.

In letteratura si possono trovare diversi lavori con i dati riguardanti le densità e le proprietà acustiche di questi due materiali ma non sono coerenti fra di loro. Ad esempio, Browne et al. nel 2003 riportano per l'agar una velocità acustica longitudinale di 1540 m/s e un coefficiente di attenuazione di 0,5 dB/cm·MHz [2]; per lo stesso materiale Brewin et al. nel 2008 ricavano una velocità longitudinale nell'intervallo 1533-1559 m/s e un'attenuazione compresa nel range 0.43-0.50 dB/cm·MHz [3].

Anche per il gelrite c'è discordanza fra le caratteristiche riportate in letteratura. Zhou et al. nel 2007 calcolano per il gelrite le seguenti caratteristiche: densità 1060 kg/m³, velocità longitudinale 1561 m/s e coefficiente di attenuazione 0,47 dB/cm·MHz [4]. Nel 2011 King et al. ricavarono per le stesse proprietà del gelrite rispettivamente i valori di 1000 kg/m³, 1561 ± 22 m/s e 0.588 dB/cm·MHz [5].

La causa della discordanza di valori è da attribuire alle diverse “ricette” per preparare i fantocci, cioè alle diverse concentrazioni e tipologie di materiali utilizzati.

Si è allora scelto di effettuare delle rilevazioni per misurare le proprietà acustiche dei gel utilizzati nei test.

3.4.1 – Test misurazione velocità acustica nei gel

Richiamando l'equazione 1.12, nel caso di onde piane l'impedenza acustica è data da:

$$Z = \rho c \quad (3.1)$$

Conoscendo la densità del materiale e l'impedenza acustica è possibile tramite la formula inversa ricavare la velocità del suono nel materiale.

L'impedenza acustica è legata al coefficiente di riflessione dalla formula 1.23. Supponendo che le densità e le velocità acustiche dei gel siano molto simili a quelle dell'acqua, supposizione supportata dai dati riportati in letteratura citati nel paragrafo precedente, in prima approssimazione si può considerare che gli angoli d'incidenza e trasmissione siano uguali. Sotto queste condizioni l'equazione 1.23 diventa:

$$R = \frac{p_r}{p_i} = \frac{Z_{gel} - Z_{acqua}}{Z_{gel} + Z_{acqua}} \quad (3.2)$$

Ricavando dalla formula precedente l'incognita Z_{gel} ed esplicitando le impedenze acustiche come nella formula 3.1, la velocità acustica nel gel è data dall'equazione:

$$c_{gel} = \frac{Z_{acqua}}{\rho_{gel}} \frac{R + 1}{R - 1} \quad (3.3)$$

Al fine di calcolare il coefficiente di riflessione si è utilizzato un trasduttore flat cilindrico da 2,4 MHz e 12 mm di diametro. Tale trasduttore a 21°C ha il piano del fuoco naturale, calcolato tramite l'equazione 1.38, ad una distanza di 59,3 mm dalla superficie del trasduttore.

Per misurare la potenza incidente un idrofono needle con tip da 1 mm è stato posizionato parallelamente all'asse acustico del trasduttore a 60 mm da esso e il segnale prodotto è stato visualizzato mediante un oscilloscopio DSOX3104A. Per la potenza riflessa invece si è approntato un set-up per posizionare la faccia di un campione di gel a 30 mm dal trasduttore e con un angolo rispetto alla normale di 45°; in posizione simmetrica rispetto alla normale alla superficie del gel è stato posizionato l'idrofono per rilevare l'entità dell'onda riflessa. Il set-up per la rilevazione dell'onda riflessa è mostrato in Fig.26. Facendo il rapporto fra le pressioni misurate si è calcolato il coefficiente di riflessione per l'agar e per il gelrite.

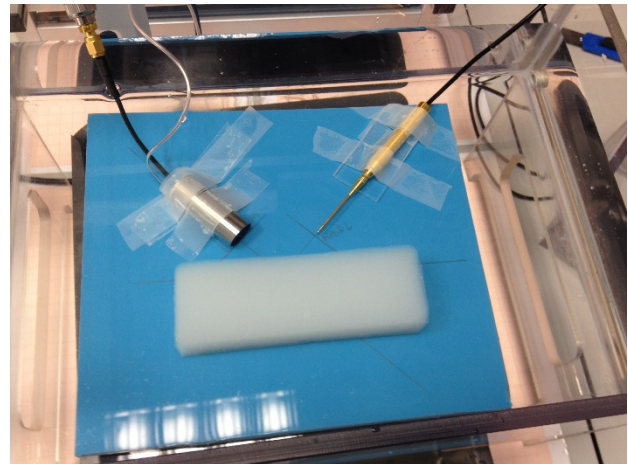


Fig. 25 Set-up misura onda riflessa dal gelpad

Tenendo conto anche delle densità misurate nel laboratorio biologico, si sono riscontrati i seguenti valori per i due gel in esame:

Tabella 2

Materiale	Densità [g/cm ³]	Coefficiente di riflessione
Agar	1,022	$6,1 \cdot 10^{-3}$
Gelrite	1,005	$2,3 \cdot 10^{-3}$

Per calcolare l'impedenza acustica dell'acqua degassata si deve considerare che la densità è 0,99 g/cm³ e che la velocità acustica è data dall'equazione:

$$c_{acqua} = 1480 + 4,2 \cdot \Delta t \text{ [m/s]} \quad (3.4)$$

dove Δt è la differenza di temperatura rispetto a quella di riferimento, 20°C.

Dato che i test sono stati effettuati in acqua degassata a 21°C si ricava un'impedenza acustica per l'acqua pari a 1,47 MRayl.

Avendo tutti i valori necessari ho potuto valutare le velocità acustiche longitudinali nei gel:

- Agar: 1463,1 m/s;
- Gelrite: 1476,5 m/sec

Dati il minore indice di riflessione e il valore di velocità acustica più simile a quello dell'acqua il gelrite apparentemente è il materiale migliore per realizzare il gelpad. In realtà oltre a questi parametri rimane da valutare l'assorbimento.

3.4.2 – Test assorbimento gel

Per valutare l'assorbimento dei materiali si sono realizzati dei cilindri di agar e gelrite. L'altezza dei cilindri è pari all'altezza dei gelpad usati per i test cellulari con il sistema MRgFUS, 4 cm.

Il gel è stato posizionato fra il trasduttore da 2,4 MHz e la punta dell'idrofono, Fig27, che si trovava alla distanza del fuoco naturale del trasduttore.

Una serie di misure precedenti al posizionamento del gel aveva permesso di posizionare l'idrofono sull'asse acustico del trasduttore e di valutare la pressione emessa in assenza di campione.

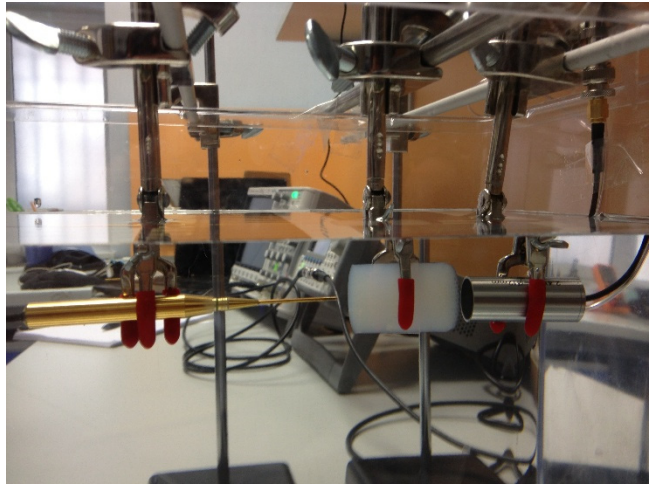


Fig. 26 Set-up per valutazione assorbimento gel

I risultati dei test hanno mostrato un assorbimento prossimo allo zero per l'agar mentre per il gelrite si è riscontrata una diminuzione della pressione in presenza di campione pari al 10%.

In seguito a queste misure si è comunque scelto di continuare a utilizzare gelpad di gelrite per le migliori proprietà macroscopiche, conservazione e resistenza. Per ovviare all'assorbimento elevato si è deciso di utilizzare potenze del 10% più alte durante le sonicazioni con il sistema clinico.

L'agar è stato comunque utilizzato come strato buffer all'interno dei pozzetti, come sarà illustrato nei prossimi paragrafi, per la sua natura biologica inerme.

3.5 – Evoluzione del set-up

Gli effetti biologici osservati in seguito all'esposizione di campioni cellulari ad ultrasuoni possono avere due cause distinte:

- l'assorbimento dell'onda acustica nel mezzo che ne causa un innalzamento di temperatura e quindi può innescare processi biologici quali, in casi estremi, la lisi cellulare [6];
- la stimolazione delle cellule da parte dell'onda meccanica. Tale stimolazione può causare, ad esempio, fenomeni di sonoporazione, aumento temporaneo della permeabilità della membrana cellulare [7].

Per effettuare dei test accurati è necessario riuscire a separare i due effetti. In particolare, l'evoluzione del set-up per esperimenti in vitro con il sistema clinico MRgFUS è stata volta ad eliminare l'effetto termico per esaltare l'effetto puramente meccanico.

Per validare le modifiche del set-up mi sono avvalso di un programma di simulazione della Weidlinger Associates Inc., il PZFlex. Tale software utilizza il metodo degli elementi finiti (FEM, dall'inglese Finite Element Method), una tecnica di calcolo numerico che fornisce soluzioni approssimate di problemi descritti da equazioni differenziali alle derivate parziali riducendo queste ultime ad un sistema di equazioni algebriche. I campi di applicazione del programma di simulazione sono diversi, dalle telecomunicazioni ai MEMs, dalle simulazioni aerospaziali a quelle per ultrasuoni medicali.

In letteratura è possibile trovare diversi lavori in cui il software PZFlex è utilizzato per simulazioni acustiche; alcuni interessanti esempi sono:

- la validazione di un modello a larga scala di propagazione di un'onda acustica in un tessuto [8];
- l'analisi di risonanze spurie, dovute a discontinuità, in trasduttori a singolo o multi elemento [9];
- la validazione di risultati sperimentali ottenuti durante un "model-built-test" di un trasduttore per imaging ecografico [10];
- la simulazione di modi di vibrazione flessurale di un trasduttore e il confronto fra i dati simulati e quelli ottenuti sperimentalmente [11].

Nel dettaglio ho utilizzato il modulo MediFlex del software PZFlex per simulare la propagazione di un'onda ultrasonica generata da un trasduttore con le stesse caratteristiche di quello impiegato nel modulo UF dell'ExAblate. Grazie alle caratteristiche acustiche dei gel, calcolate nei paragrafi precedenti, ho potuto definire nel software dei nuovi materiali migliori di quelli di libreria. Per il polistirene, di cui sono costituite le multiwell, ho invece utilizzato le caratteristiche riportate da Hensel et al. [12].

3.5.1 – Set-up I

Inizialmente la multiwell veniva posizionata al di sopra del gelpad di gelrite e le soluzioni cellulari erano contenute all'interno dei pozzetti a diretto contatto con il fondo di polistirene. Per evitare la presenza di aria, le intercapedini cave fra le well erano riempite di agar. Una schematizzazione del set-up utilizzata per la simulazione è mostrata nella Fig.29.

Come riportato nelle procedure sperimentali del *par.3.3*, il fuoco del trasduttore è posto ad una distanza di 5 mm dal campione biologico, e quindi considerando lo spessore del polistirene, a circa 3

mm dal fondo inferiore della multiwell. Nonostante ciò, in alcuni test, si è notata una leggera degradazione nella parte centrale del fondo dei pozzetti sonicati.



Fig. 27 Schematizzazione set-up I

Si è ipotizzato che il polistirene sottoposto all'onda acustica si surriscaldasse. Tale ipotesi è stata validata dalle simulazioni. In Fig.28a è riportata la mappa di temperatura ottenuta; si può notare come in corrispondenza al centro del fondo del polistirene sia presente un accumulo di temperatura con un valore massimo di quasi 40°C. Questo risultato è confermato anche dalle immagini termiche MR ricavate durante il trattamento: la zona rossa in Fig.28b indica un innalzamento di temperatura ed è localizzata sul fondo della well sonicata.

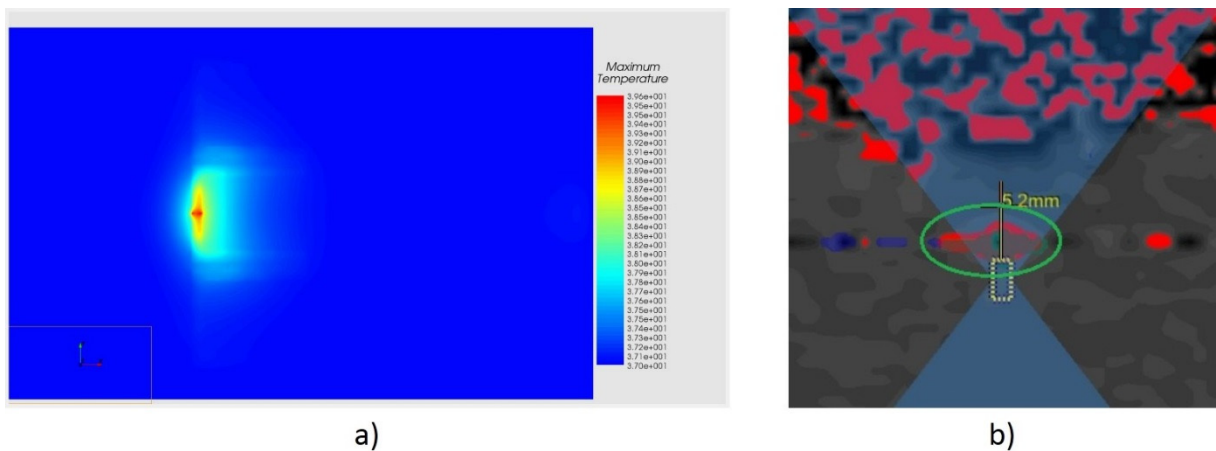
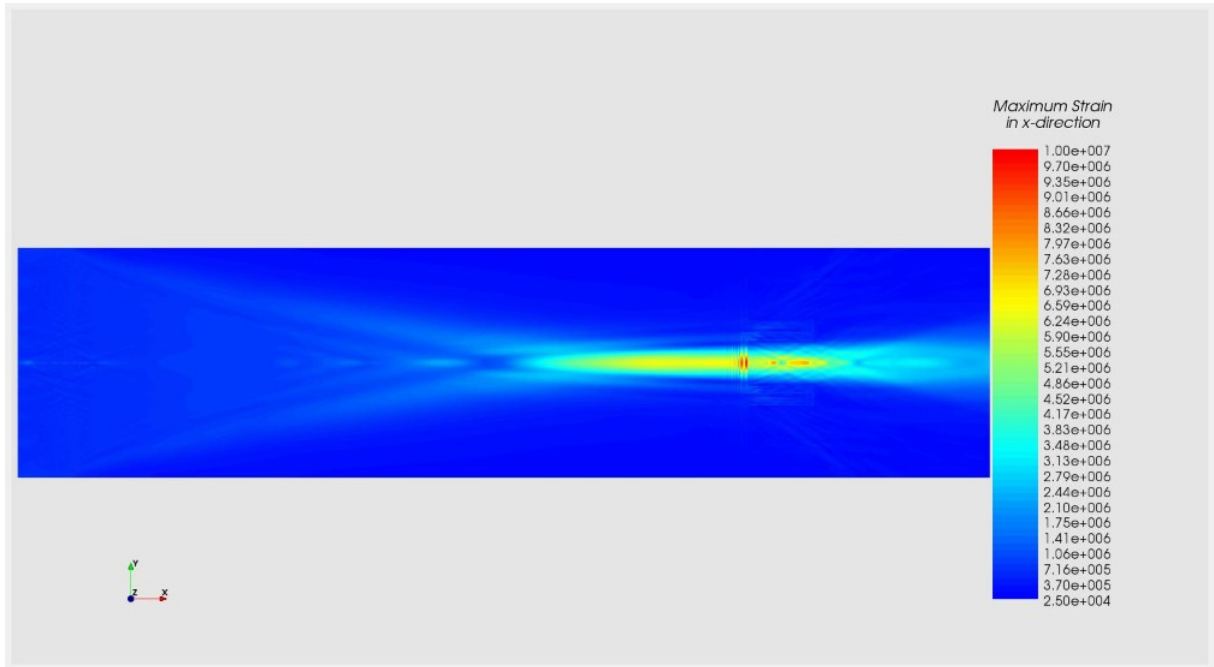


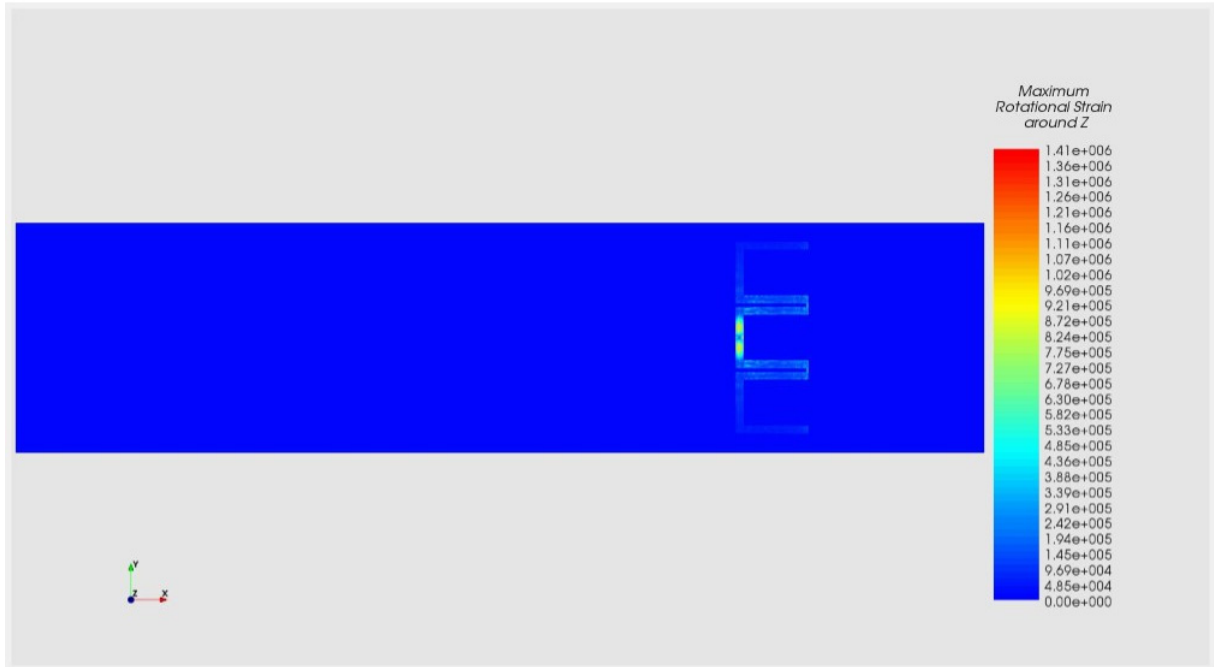
Fig. 28 a) mappa termica simulata con PZFlex, si nota un surriscaldamento del fondo della well; b) mappa termica ottenuta dal sistema MR durante un test sperimentale, si nota anche qui un surriscaldamento, area rossa, del fondo della well.

Basandosi sui risultati della simulazione, il fondo rigido della well sottoposto all'azione meccanica dell'onda acustica tende ad essere deformato; tale deformazione provoca per attrito un surriscaldamento del polistirene. In Fig30a, dove è riportata l'entità della deformazione lungo la direzione x di propagazione dell'onda acustica dei materiali attraversati dagli ultrasuoni, si può notare un'area di deformazione intensa localizzata all'interno dello spessore del fondo della multiwell.

Dai risultati della simulazione si deduce che avviene anche una conversione di modo all'interfaccia gelrite-polistirene; infatti non si spiegherebbe in altro modo la deformazione attorno all'asse z, uscente dal piano di visualizzazione dei risultati, del fondo della well mostrata in Fig30b.



a)



b)

Fig. 29 Risultati simulazione di deformazione dei materiali: a) lungo l'asse x, direzione di propagazione dell'onda, b) attorno all'asse z, normale al piano di visualizzazione dei risultati.

3.5.2 – Set-up II

Per allontanare la soluzione cellulare dal polistirene del fondo i biologi hanno pensato di inserire uno strato di agar per creare un buffer termico. La schematizzazione del set-up per la simulazione è riportata in Fig.31.

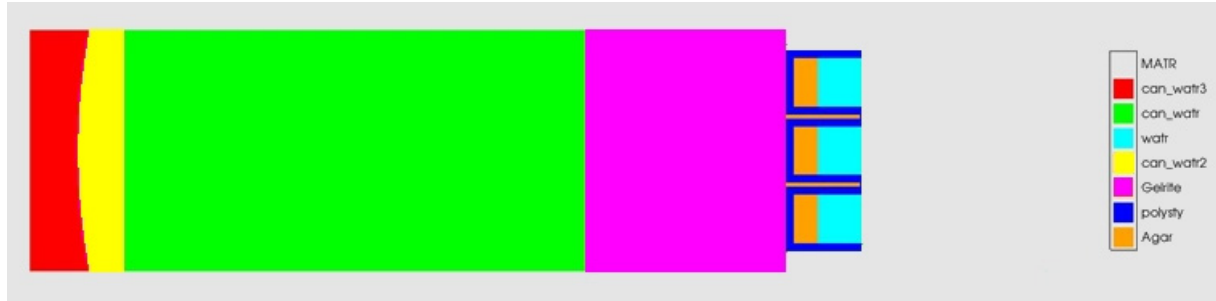


Fig. 30 Schematizzazione set-up II

Lo strato di agar assicura un gradiente termico che permette alla soluzione contenente i campioni cellulari di non essere sensibilmente influenzata dal surriscaldamento del fondo della well. Come si può notare dalla Fig.32 è sempre presente un hot spot all'interno dello spessore di polistirene ma l'area che va dal giallo all'azzurro alla sua destra è molto meno ampia rispetto a quella riscontrata per il precedente set-up, riportata nella Fig.28a.

I risultati delle simulazioni di deformazione lungo l'asse x e attorno all'asse z rimangono, invece, sostanzialmente invariate rispetto al caso precedente anche se il fuoco è leggermente più vicino al fondo.

Con questo set-up si è ovviato al problema di surriscaldamento della soluzione ma si è continuata a registrare una certa variazione nei

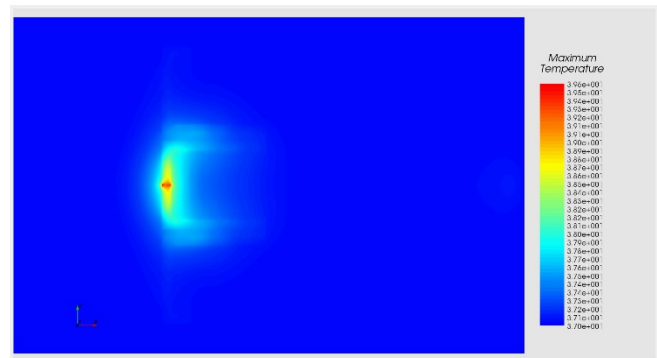


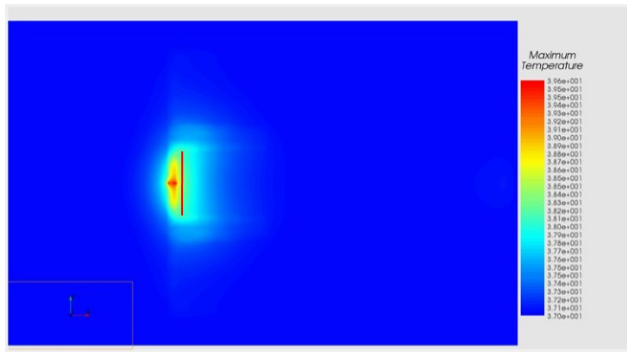
Fig. 31 Simulazione mappa termica set-up II

risultati biologici ottenuti durante i test. La causa è stata imputata alla distribuzione aleatoria delle cellule depositate sul fondo della soluzione. Nei pozzetti in cui le cellule si distribuiscono maggiormente nella periferia della well l'effetto biologico è inferiore a causa del decadimento trasversale della pressione acustica rispetto alla direzione di propagazione, in quelli in cui invece le cellule si dispongono nell'area centrale si registra un effetto maggiore.

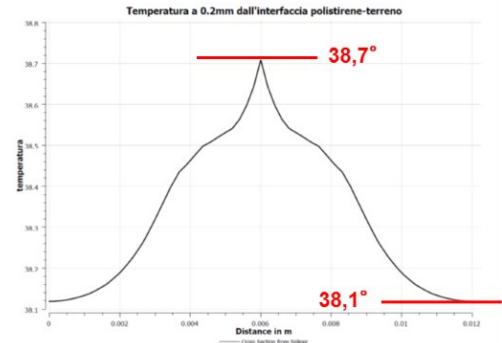
3.5.3 – Set-up III

La soluzione per ovviare alle fluttuazioni di risultati dovuta alla distribuzione aleatoria delle cellule proposta dai biologi con cui ho collaborato è stata quella di sagomare l'agar all'interno della well per creare una cavità a forma di tronco di cono. Tale accorgimento riduce il raggio della superficie su cui le

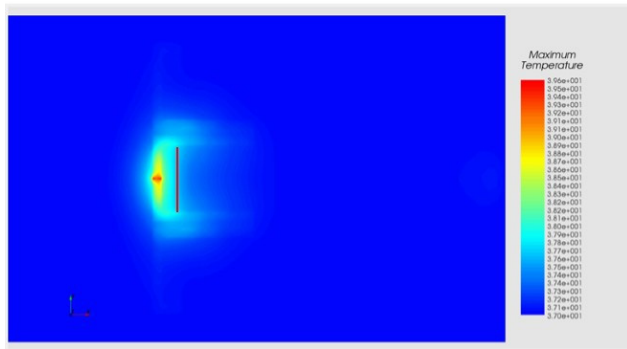
Infine, nel profilo dell'ultimo set-up, in Fig.34f, si ha un incremento di temperatura leggermente superiore al caso precedente, il buffer di agar è meno spesso, ma il delta di temperatura fra centro e periferia è dell'ordine dei centesimi di grado.



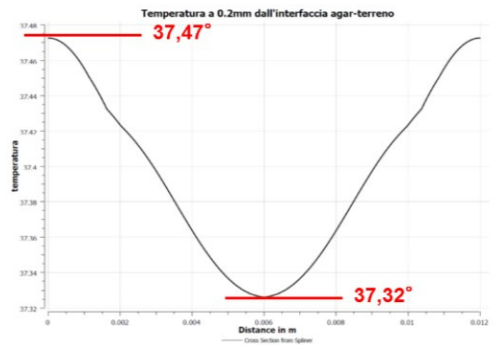
a)



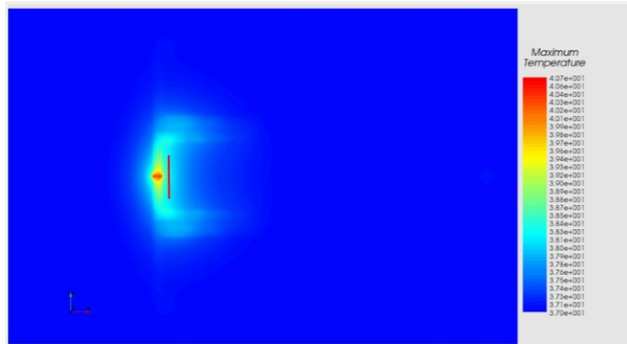
b)



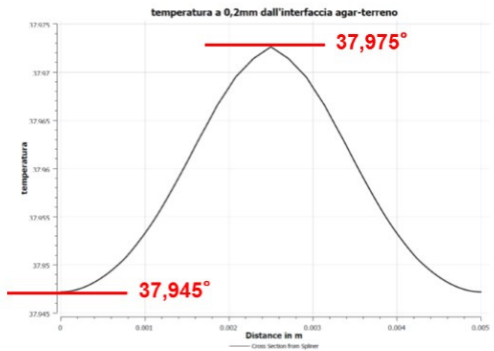
c)



d)



e)



f)

Fig. 33 Le figure a), c) ed e) mostrano il posizionamento del segmento per il calcolo dei profili di temperatura nelle simulazioni termiche rispettivamente del primo, del secondo e del terzo set-up, le figure b), d) ed f) sono i profili di temperatura rispettivamente del primo, del secondo e del terzo set-up

Bibliografia

- [1] Gibson, L. J., & Ashby, M. F. (1997). *Cellular solids: structure and properties*. Cambridge university press.
- [2] Browne, J. E., Ramnarine, K. V., Watson, A. J., & Hoskins, P. R. (2003). Assessment of the acoustic properties of common tissue-mimicking test phantoms. *Ultrasound in medicine & biology*, 29(7), 1053-1060.
- [3] Brewin, M. P., Pike, L. C., Rowland, D. E., & Birch, M. J. (2008). The acoustic properties, centered on 20 MHz, of an IEC agar-based tissue-mimicking material and its temperature, frequency and age dependence. *Ultrasound in medicine & biology*, 34(8), 1292-1306.
- [4] Zhou, S., Yin, X., & Petruzzello, J. (2007, October). P3C-9 Simulation and Experiment Results of a 1D High Intensity Focused Ultrasound Array for Acoustic Hemostasis Applications. In *Ultrasonics Symposium, 2007. IEEE* (pp. 1792-1795). IEEE.
- [5] King, R. L., Liu, Y., Maruvada, S., Herman, B., Wear, K., & Harris, G. R. (2011). Development and characterization of a tissue-mimicking material for high-intensity focused ultrasound. *Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, IEEE Transactions on*, 58(7), 1397-1405.
- [6] Kaufman, G. E., Miller, M. W., Griffiths, T. D., Ciaravino, V., & Carstensen, E. L. (1977). Lysis and viability of cultured mammalian cells exposed to 1 MHz ultrasound. *Ultrasound in medicine & biology*, 3(1), 21-25.
- [7] Delalande, A., Leduc, C., Midoux, P., Postema, M., & Pichon, C. (2015). Efficient Gene Delivery by Sonoporation Is Associated with Microbubble Entry into Cells and the Clathrin-Dependent Endocytosis Pathway. *Ultrasound in medicine & biology*.
- [8] Mould, J. C., Wojcik, G. L., Carcione, L. M., Tabei, M., Mast, T. D., & Waag, R. C. (1999). Validation of FFT-based algorithms for large-scale modeling of wave propagation in tissue. In *Ultrasonics Symposium, 1999. Proceedings. 1999 IEEE* (Vol. 2, pp. 1551-1556). IEEE.
- [9] Reynolds, P., Hyslop, J., & Hayward, G. (2003, October). Analysis of spurious resonances in single and multi-element piezocomposite ultrasonic transducers. In *Ultrasonics, 2003 IEEE Symposium on* (Vol. 2, pp. 1650-1653). IEEE.
- [10] Powell, D. J., Wojcik, G. L., Desilets, C. S., Gururaja, T. R., Guggenberge, K., Sherrit, S., & Mukherjee, B. K. (1997, October). Incremental “model-build-test” validation exercise for a 1-D biomedical ultrasonic imaging array. In *Ultrasonics Symposium, 1997. Proceedings., 1997 IEEE* (Vol. 2, pp. 1669-1674). IEEE.
- [11] Eriksson, T. J. R., Ramadas, S. N., & Dixon, S. M. (2016). Experimental and simulation characterisation of flexural vibration modes in unimorph ultrasound transducers. *Ultrasonics*, 65, 242-248.

- [12]Hensel, K., Mienkina, M. P., & Schmitz, G. (2011). Analysis of ultrasound fields in cell culture wells for in vitro ultrasound therapy experiments. *Ultrasound in medicine & biology*, 37(12), 2105-2115.

CAPITOLO IV – SonoWell

Nel capitolo precedente è stato mostrato come ottenere un set-up robusto e con un alto fattore di riproducibilità dei risultati utilizzando due sistemi per uso clinico senza nessuna customizzazione hardware. In letteratura sono presenti testimonianze di altri studi in vitro con sistemi simili a quello ottenuto. Gourevich et al. nel 2012 pubblicarono un lavoro sul drug delivery in cellule di carcinoma umano; per la sonicazione utilizzarono un sistema FUS ExAblate 2000 in combinazione con una risonanza magnetica da 1,5 T [1]. L'anno seguente, il 2013, Durst et al. mediante un sistema FUS ExAblate 400 e un sistema MR da 3 T provocarono la lisi completa di coaguli di sangue in modelli di vasi sanguigni umani [2].

La principale limitazione di set-up come quelli finora analizzati è costituita dall'elevato costo dei sistemi FUS ed MR e la poca dinamicità dei software di gestione.

Tutti i test in vitro condotti con il sistema clinico hanno messo in luce la necessità di una pianificazione fine del trattamento. Inoltre si è rilevato che le mappe termiche elaborate dalla risonanza non forniscono informazioni utili sulla temperatura dei campioni cellulari perché compromesse da artefatti dovuti al terreno acquoso di coltura delle cellule. Per ovviare ai problemi di pianificazione e svincolarsi dal sistema MR è stato deciso di progettare un sistema benchtop utilizzabile esclusivamente per la sperimentazione cellulare, il SonoWell.

La realizzazione del sistema è stata eseguita in collaborazione con la Image Guided Therapy, IGT, (Pessac, Francia). Il 21 gennaio 2014 è stata depositata all'ufficio di Roma la richiesta di brevetto per lo strumento benchtop, numero di deposito RM2014A000031. Un anno dopo, il 20 gennaio 2015, tale richiesta di brevetto è stata inviata al Patent Cooperation Treaty (PCT) diventando di fatto una richiesta di brevetto a copertura mondiale [3].

4.1 – Overview parametri US e caratteristiche trasduttori in letteratura

Il primo passo per la progettazione del nuovo sistema è stato effettuare una ricerca bibliografica sui lavori presenti in letteratura. Si è riscontrato che la frequenza, l'intensità, il segnale di pilotaggio e le caratteristiche fisiche dei trasduttori cambiano molto a seconda dell'effetto biologico che si vuole ottenere. Nella tabella 3 sono riportati i dati di alcuni articoli divisi per obiettivo sperimentale.

Si può notare che, sebbene più della metà dei lavori citati usi frequenze fra 1 e 1,5 MHz, il range di frequenze generalmente utilizzate è molto ampio, si va da 40 kHz [4] a 10 MHz [11] e anche all'interno dello stesso gruppo non si ha uniformità.

Tabella 3

	Riferimento letteratura	f	Trasduttore	Pilotaggio	Intensità/ potenza	Pressione
Modifica permeabilità membrana cellulare	Fechheimer M. et al. 1987 [4]	40 kHz	Flat	CW	-	-
	Hee Joong K. et al. HGT 1996 [5]	1 MHz	35 mm Flat	CW	-	400 kPa
	Kodama T et al. 2006 [6]	1 MHz	30 mm Flat	Pulsato duty cycle 20%	1,9 W/cm ²	190-280 kPa
	Endo-Takahashi Y. et al. 2012 [7]	2 MHz	6 mm Flat	Pulsato duty cycle 50%	2 W/cm ²	-
	Ghoshal G. et al. 2012 [8]	1 MHz	19 mm Focused	Pulsato duty cycle 20%	10-20W	0.5-1.3 MPa
	Kim Y.S.. et al. 2011 [9]	1.4 MHz	Annular focused	Pulsato	-	> 7 MPa
	Pitt W.G. et al. 1994 [10]	67 kHz	Flat	CW	27W	-
	Qian Z. et al. 1999 [11]	44-70-500 kHz, 2-25-10 MHz	-	Pulsato uty cycle 10%	300 mW/cm ²	-
Stimolazione metabolica	Pitt W.G. & Ross S.A. 2003 [12]	70 kHz	Flat	CW	0-2.8 W/cm ²	-
	Kim J.R. et al. 2013 [13]	1 MHz	16 mm	Pulsato duty cycle 20%	0,4 W/cm ²	-
	Nagata K. et al. 2013 [14]	3 MHz	4,5 cm ²	Pulsato duty cycle 20%	30 mW/cm ²	-
	Fung C. et al 2014 [15]	1,5 MHz	22 mm	-	30 mW/cm2	-
Stimolazione meccanica e termica	Wright C.C. et al. 2012 [16]	1.51 MHz	100 mm focused	Pulsato duty cycle 90,9%	1000W	-
	Zhang S. et al. 2012 [17]	3.3 MHz	64 mm focused	Pulsato duty cycle 90,9%	85W	> 5 MPa
	Xu J. et al. 2012 [18]	1.1 MHz	63.6 mm focused	Pulsato duty cycle 0.15-1.8%	4800 W/cm ²	9.8 MPa
	Bigelow T.A. et al. 2009 [19]	1.1 MHz	70 mm Focused	Pulsato	80.68 W	275 kPa

I valori di potenza maggiori sono richiesti quando si vuole ottenere un incremento di temperatura notevole dei campioni o una forte stimolazione meccanica. La necessità di intensità elevate di queste applicazioni è associata all'uso di trasduttori focalizzati [16][17][18][19].

Per il pilotaggio dei trasduttori viene maggiormente utilizzato un segnale pulsato, invece di un segnale continuo (CW), con un valore di duty cycle variabile. Tralasciando gli estremi, superiori al 90% [16][17], fra i lavori che riportano tale dato la metà ha scelto di usare un duty cycle basso, il 20% [6][8][13][14].

Considerando infine l'intensità acustica, valori comunemente utilizzati per la stimolazione metabolica oscillano fra le decine e le centinaia di milliwatt, mentre per modificare la membrana cellulare si adoperano intensità leggermente più alte.

4.2 – Caratteristiche trasduttori utilizzati

I trasduttori impiegati nella versione alfa del SonoWell sono stati prodotti dalla Imasonic SAS (Voray sur l'Ognon, Francia) e le considerazioni che hanno portato alla scelta delle loro caratteristiche saranno illustrate in questo paragrafo.

4.2.1 - Frequenze

Si è scelto di utilizzare quattro trasduttori a frequenze diverse in modo da coprire un range abbastanza ampio così da avere la possibilità di realizzare varie tipologie di esperimenti.

In alcuni studi analizzati [4][10][11][12] sono impiegate frequenze ultrasonore fra i 40 e i 70 kHz. Tali frequenze sono molto basse, quasi al limite dell'udibile, e comportano una serie di problemi realizzativi:

- il materiale piezoelettrico che costituisce la lamina vibrante del traduttore è spesso, c'è una proporzionalità inversa fra frequenza e spessore della lamina. Ciò comporta una maggiore inerzia alle vibrazioni e quindi un'efficienza di trasformazione elettroacustica bassa;
- la lunghezza d'onda, in acqua a 20°C, del fascio emesso da un trasduttore a 40 kHz è di 37 mm. Per instaurare i modi vibrazionali corretti è necessaria una lamina piezoelettrica di notevole area, e quindi un trasduttore con un grande diametro;
- a meno di non impiegare trasduttori di grosse dimensioni, la divergenza del fascio emesso, calcolata con l'equazione 1.39, è molto elevata.

I primi due punti possono essere considerati dei limiti realizzativi, il terzo invece è un limite di progetto perché influenza la posizione reciproca dei trasduttori per evitare sovrapposizioni delle onde emesse.

Un ulteriore limite, questa volta sia inferiore che superiore, per le frequenze da utilizzare è dovuto alla banda del generatore di segnali impiegato per pilotare i trasduttori. Tale generatore, già commercializzato dalla IGT, ha una banda nel range 500kHz-5MHz.

Dall'analisi dei lavori presentati schematicamente nella tabella 3 si è già notata la prevalenza dell'uso di frequenze intorno al valore di 1 MHz. Per tale motivo questa è stata la prima frequenza scelta per il sistema benchtop. Inoltre, utilizzare un trasduttore con banda centrata ad 1 MHz permette di avere un confronto diretto fra i risultati biologici ottenuti con il SonoWell e quelli ottenuti con il set-up messo a punto per il sistema MRgFUS clinico presentato nel capitolo III, che sono stati ottenuti sonicando i campioni con un fascio di frequenza 1,05 MHz.

Per esplorare gli effetti delle basse frequenze si è scelto di utilizzare un trasduttore centrato a 650 kHz, per assicurarsi di essere sufficientemente lontani dal limite inferiore della banda del generatore e quindi evitare distorsioni del segnale. Con considerazioni analoghe si è scelta la frequenza di 4,5 MHz come centro banda del trasduttore ad alta frequenza.

In ultimo, per colmare il gap di frequenze fra 1 MHz e 4,5 MHz è stato scelto il valore di 2,4 MHz per il quarto trasduttore.

Durante la selezione delle frequenze da utilizzare si è evitato che le armoniche dei segnali emessi, fino alla quinta armonica, possano sovrapporsi perturbando le misure. I valori delle armoniche sono riportati nella tabella 4.

Tabella 4

Frequenze trasduttori [kHz]			650	1000	2400	4500
Armoniche	Prima		1300	2000	4800	9000
	Seconda		1950	3000	7200	13500
	Terza		2600	4000	9600	18000
	Quarta		3250	5000	12000	22500
	Quinta		3900	6000	14400	27000

4.2.2 – Intensità acustica e focalizzazione

Un altro parametro che può limitare le applicazioni del sistema è la potenza emessa dai trasduttori. Tale parametro sarà unico per i quattro trasduttori, per permettere il confronto fra i risultati dei test al variare della frequenza ma mantenendo la stessa intensità acustica.

I trasduttori utilizzati nella prima versione del SonoWell emettono un'intensità acustica massima di 6 W/cm² in regime CW. Modulando il duty cycle del segnale pilota è stato possibile ottenere intensità più basse compatibili con gli altri lavori analizzati.

Dalla review sulla letteratura schematizzata nella tabella 3 si può anche notare come per emettere basse intensità si preferisca utilizzare trasduttori di tipo flat. Tale decisione è giustificata dalla maggiore

omogeneità del campo emesso al variare della distanza dalla superficie del trasduttore e da una semplificazione nella produzione; la lamina vibrante non deve essere sagomata ma lasciata planare, così da ridurre i costi di vendita.

Utilizzare un trasduttore piano e con un'intensità acustica medio-bassa ha anche il notevole vantaggio di semplificare la progettazione del sistema di raffreddamento.

Per i motivi sopra esposti si è deciso di utilizzare trasduttori flat come default nel sistema progettato.

4.2.3 – Dimensioni

Il diametro dell'elemento attivo è stato scelto tenendo conto dei supporti biologici da utilizzare. Per continuità con i test effettuati con il set-up per esperimenti in vitro con il sistema MRgFUS clinico si è deciso di ottimizzare il SonoWell per la sonicazione di campioni cellulari contenuti in multiwell da 24 pozzetti. Considerando che il diametro inferiore di un pozzetto di una MW da 24 comunemente usata, Corning Constar 24W 3526, Falcon DB 24W 35-1147, Orange Scientific 24W 5530300, TPP 24W 92024, varia da 15.35 mm a 15.53 mm, si è deciso di utilizzare trasduttori con diametro dell'elemento attivo pari a 12 mm. In tal modo è possibile lasciare un margine di 1,67-1,76 mm, a seconda della marca utilizzata, per ogni lato in modo da minimizzare effetti di scattering ai bordi dello stesso pozzetto che si intende sonicare.

Considerando lo strato di isolamento e il case esterno in acciaio inossidabile il diametro totale della sonda raggiunge i 18 mm.

Sulla lunghezza del case ha influito la scelta del backing material. Come già discusso nel *par.1.8*, tale materiale ha il compito di smorzare le oscillazioni dell'elemento attivo e, oltre ad altri effetti, proteggere la lamina piezoelettrica dalla rottura. In alcuni casi è possibile utilizzare come backing material l'aria, si parla di trasduttori air backed, invece di materiali solidi, solid backed. A parità di diametro dell'elemento attivo, le sonde air backed sono più leggere e corte ma risultano essere più fragili.

Per i trasduttori utilizzati nel SonoWell si è scelta l'opzione solid backed in modo da avere dei trasduttori più solidi e resistenti e per avere una superficie d'acciaio laterale maggiore per il raffreddamento del trasduttore, di cui si parlerà in dettaglio più avanti.

La lunghezza dei quattro trasduttori realizzati dalla Imasonic per Promedica è di 50 mm.

4.2.4 – Campi emessi e piani focali

Le scelte delle dimensioni dell'elemento attivo del trasduttore e della non focalizzazione di esso non hanno origine solo da considerazioni sulla letteratura, sulle dimensioni dei supporti biologici e sui costi. E' stata effettuata anche un'analisi preliminare sui campi emessi da vari tipi di trasduttori prima di optare per dei trasduttori flat cilindrici.

L'analisi è stata basata su una serie di simulazioni effettuate mediante il programma di simulazione Field II. La prima versione di tale software è stato sviluppato da Jensen agli inizi degli anni '90 [20][21] ed esiste una versione gratuita del programma che funziona in ambiente MATLAB. Il Field II utilizza il concetto di risposta spaziale all'impulso, sviluppata da Tupholme e Stepanishen [22][23][24]. La risposta spaziale all'impulso contiene informazioni sul campo ultrasonoro emesso in un punto specifico dello spazio in funzione del tempo, quando il trasduttore è eccitato da un segnale delta di Dirac. Cambiando il segnale di eccitazione, il campo emesso può essere ricavato convolvendo la risposta spaziale all'impulso e la funzione del segnale eccitante. La risposta all'impulso varierà in funzione della posizione relativa al trasduttore, da cui il nome risposta all'impulso spaziale.

Sono state simulate diverse soluzioni per i trasduttori da impiegare. In particolare si è indagata la possibilità di impiegare un phased array al posto di un trasduttore a singolo elemento. I risultati delle simulazioni hanno dimostrato che per ottenere un campo ben collimato, come quello ottenuto da una sonda a singolo elemento, sono necessari almeno sedici elementi, disposti in una matrice 4x4. La simulazione del campo emesso a 1 MHz da un trasduttore di questo tipo è mostrata in Fig.35. Un trasduttore phased array così fatto ha sicuramente diversi vantaggi, tra cui la possibilità di realizzare uno steering elettronico per spostare il fuoco e di modificare la grandezza dell'area focale, ma necessita di un segnale pilota per ogni elemento. Ciò complica la struttura del generatore da utilizzare.

Si è preferita la possibilità di utilizzare più trasduttori a singolo elemento a diversa frequenza per allargare il campo di utilizzo dello strumento invece che un solo phased array.

Il campo emesso dai trasduttori scelti coincide con quello trattato nei *par1.6* e *par1.6.1*. e la distanza del fuoco naturale e della divergenza nel far field possono essere calcolate rispettivamente tramite le equazioni 1.38 1.39. Anche a parità di diametro dell'elemento attivo, il fuoco naturale e la divergenza, essendo dipendenti dalla lunghezza d'onda, saranno differenti per i quattro trasduttori. Ragionando in termini di frequenza, la distanza del fuoco naturale è direttamente proporzionale alla frequenza; al contrario la divergenza è inversamente proporzionale alla frequenza.

Le simulazioni ottenute con il software Field II dei campi emessi dai quattro trasduttori impiegati nel SonoWell sono riportate in Fig.36 e Fig.37.

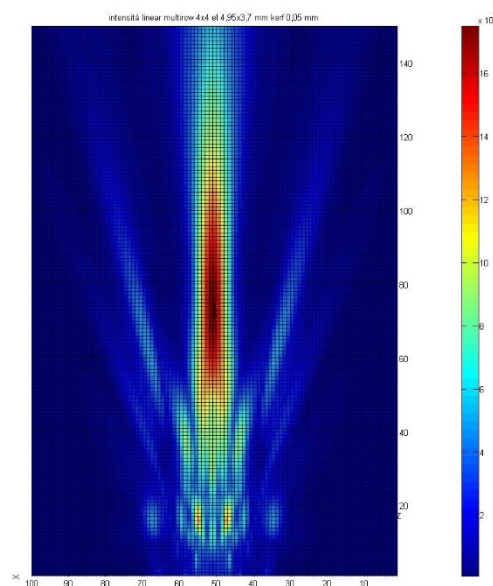
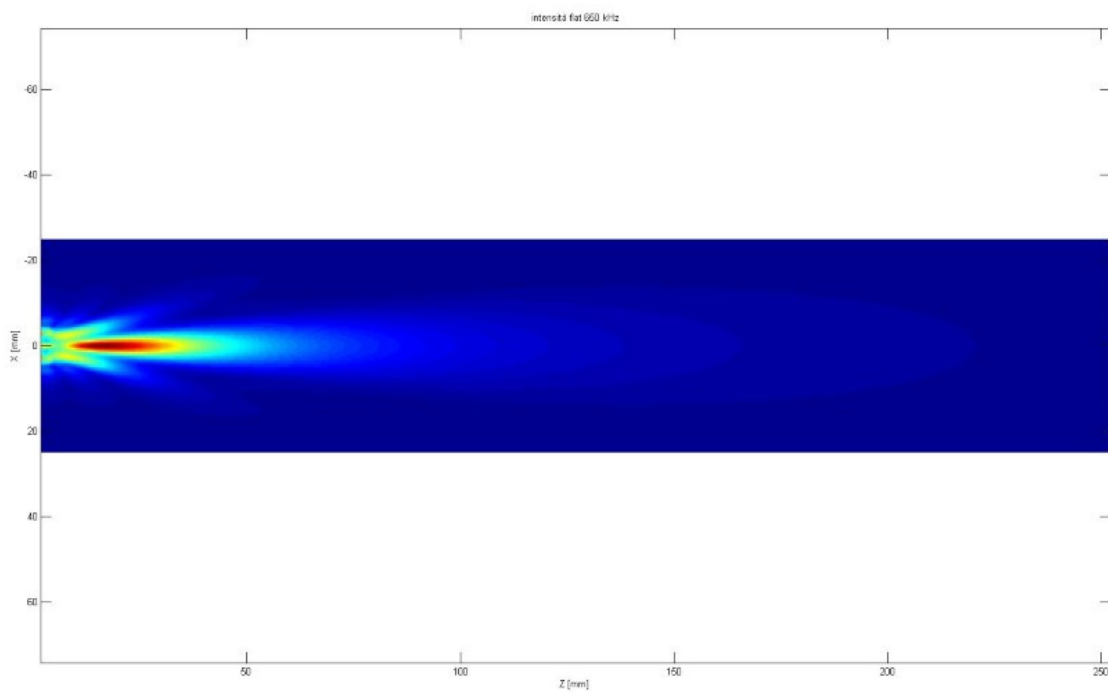
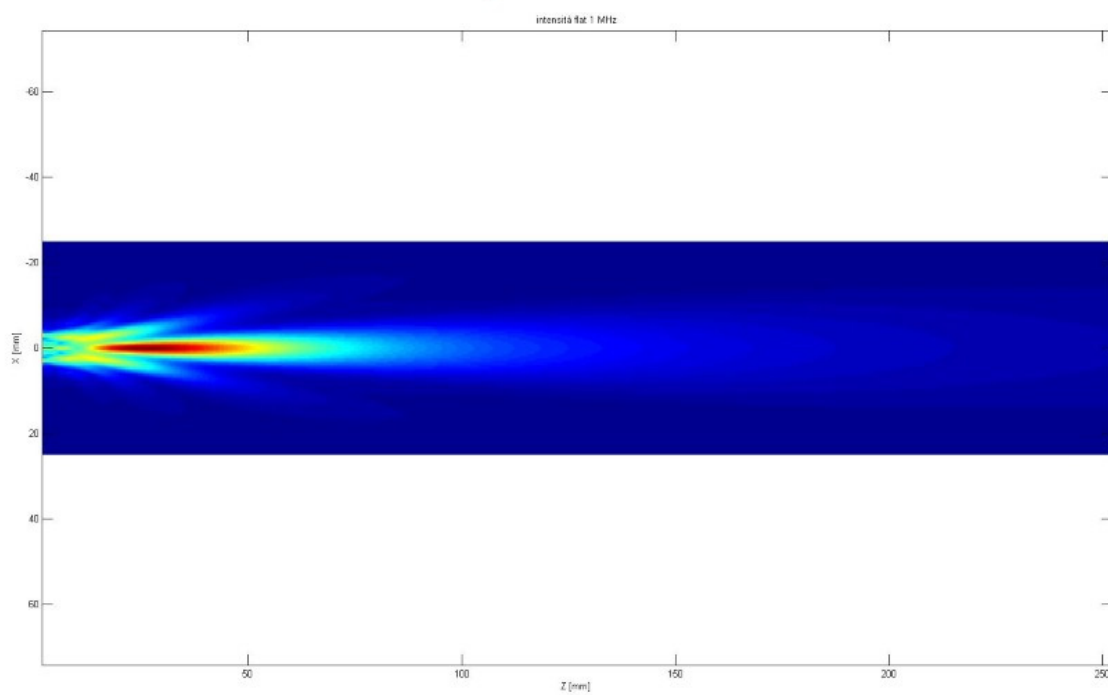


Fig. 34 Simulazione campo emesso da un trasduttore phased array 4x4 da 1 MHz

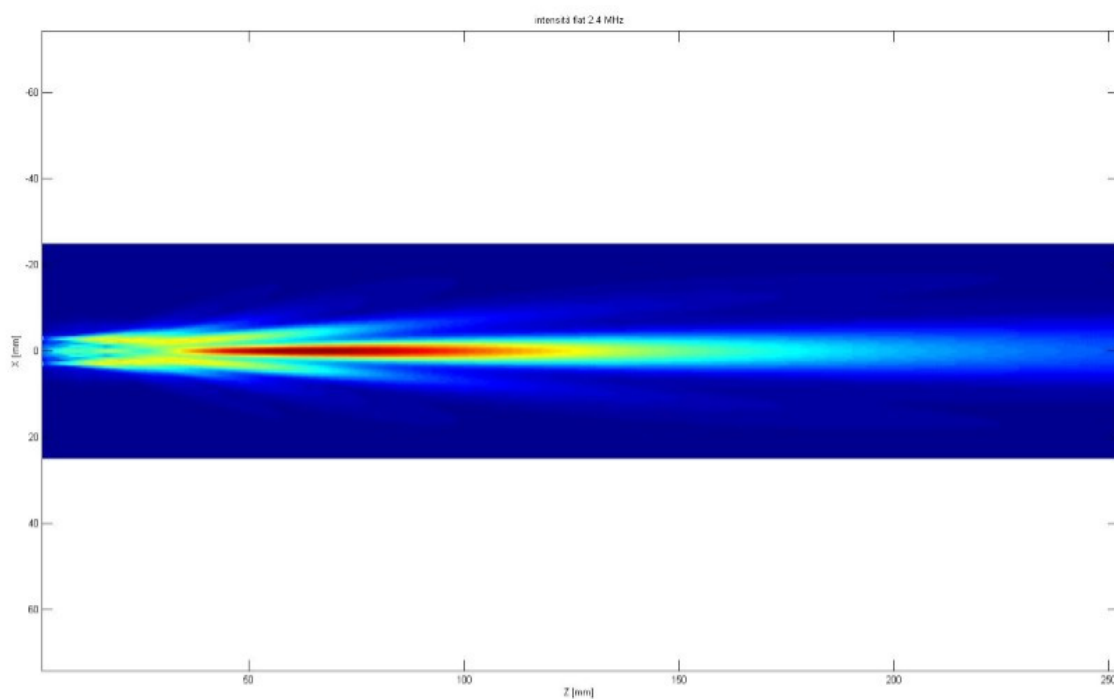


a) 650 kHz

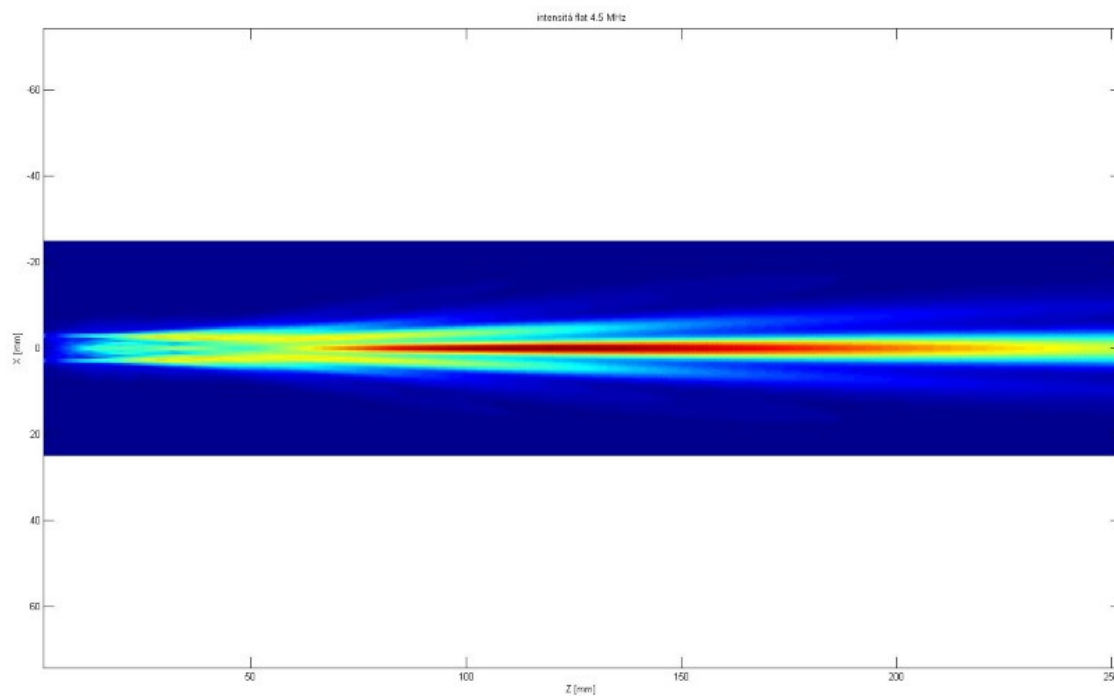


b) 1 MHz

Fig. 35 Simulazioni con Field II dei campi emessi dai trasduttori flat a singolo elemento con diametro 12 mm a) a 650 kHz e b) a 1 MHz



a) 2,4 MHz



b) 4,5 MHz

Fig. 36 Simulazioni con Field II dei campi emessi dai trasduttori flat a singolo elemento con diametro 12 mm a) a 2,4 MHz e b) a 4,5 MHz

Analizzando le quattro figure si nota subito che, in accordo con quanto su detto, il trasduttore da 4,5 MHz emette il fascio con distanza focale maggiore e maggiormente collimato, mentre quello da 650 kHz avrà il fuoco naturale più vicino all'elemento attivo rispetto agli altri ma anche la maggiore divergenza. Tali differenze sono state la causa di varie difficoltà di progettazione del supporto dei trasduttori; questo argomento verrà trattato diffusamente nel *par.4.5*.

Un elemento molto importante che può essere dedotto sempre dalle Fig.36 e Fig.37 è che le dimensioni trasversali del fuoco sono identiche. Questo assicura una sonicazione del volume delle well omogenea al variare della frequenza del trasduttore e rende quindi i risultati ottenuti confrontabili.

4.2.5 – Pilotaggio trasduttori

I segnali comunemente utilizzati per pilotare i trasduttori ad ultrasuoni sono di tipo burst tone. La base di un segnale di questo tipo è costituita da “impulsi” formati da un numero fisso di cicli di sinusoide; questi impulsi sono inviati al trasduttore periodicamente con un intervallo di tempo fisso fra un invio ed il successivo. La frequenza dell'onda sinusoidale che forma i pacchetti deve essere all'interno della banda di emissione del trasduttore e coinciderà con la frequenza dell'onda acustica emessa.

La pulse repetition frequency è invece la frequenza con cui vengono inviati gli impulsi al trasduttore. In alcuni casi si parla anche di repetition time, intendendo con questo termine il periodo tra l'invio di due impulsi successivi. Facendo il rapporto tra il tempo in cui è presente l'impulso ed il repetition time si ottiene il duty cycle del segnale pilota.

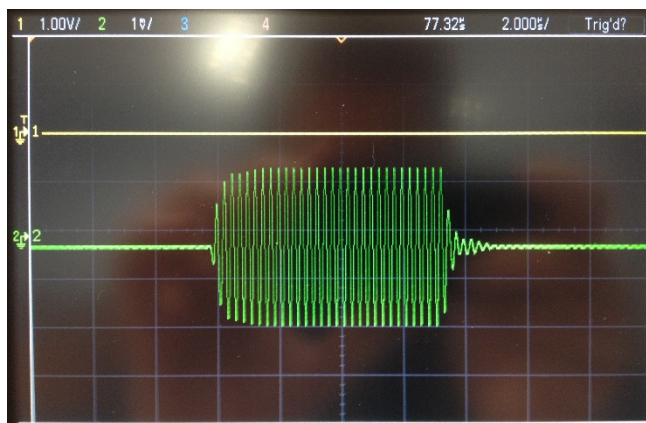


Fig. 37 Risposta del trasduttore da 4,5 Mhz ad un impulso del segnale burst tone

La risposta del trasduttore a 4,5 MHz ad un impulso formato da trenta cicli di una sinusoide alla stessa frequenza è mostrata in Fig.38. Il segnale è stato rilevato da un idrofono needle della pa con una tip da 0,5 mm e visualizzato su un oscilloscopio Agilent DSOX3104A. Nella risposta all'impulso si possono individuare tre fasi:

1. la fase iniziale di crescita esponenziale, che coincide con il periodo di vibrazione iniziale della lamina piezoelettrica;
2. la fase centrale di ampiezza fissa, che coincide con il raggiungimento ed il mantenimento della risonanza nel cristallo;
3. la fase di decrescita esponenziale, che coincide con lo smorzamento delle oscillazioni causato dall'assenza del segnale eccitante.

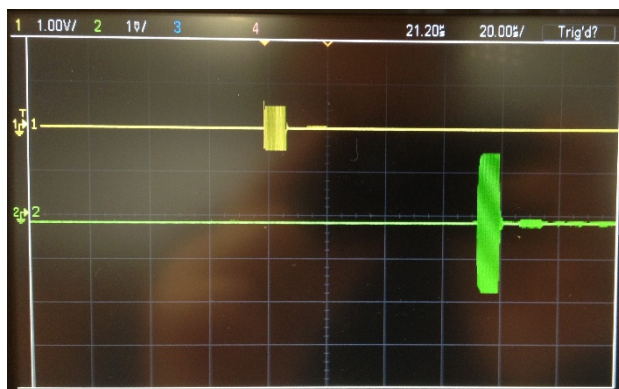


Fig. 38 Ritardo di generazione dell'onda acustica. In giallo l'impulso pilota; in verde la risposta del trasduttore

L'onda di pressione generata dal trasduttore sarà temporalmente in ritardo rispetto al segnale elettrico di eccitazione. Sempre nel caso del trasduttore da 4,5 Mhz precedente tale ritardo è stato stimato in circa 73 μ s, vedi Fig.39.

4.3 – Circuiti di matching

L'efficienza di trasformazione di un qualsiasi trasduttore non può mai essere del 100%. Nel caso dei trasduttori ad ultrasuoni valori accettabili sono al di sopra del 50%; tipicamente in commercio si trovano trasduttori con efficienze nel range compreso fra il 60% e l'80%.

La parte di potenza elettrica fornita al trasduttore che non viene trasformata in potenza acustica irradiata si deve principalmente a due fattori:

- La riflessione di una parte del segnale elettrico inviato al trasduttore;
- La potenza dissipata sotto forma di calore nel materiale piezoelettrico.

Per diminuire la potenza dissipata in calore si può agire sul repetition time e sul duty cycle del segnale elettrico di pilotaggio. Dal duty cycle dipende anche l'intensità acustica dell'onda emessa, quindi è necessario trovare sperimentalmente un compromesso fra queste due esigenze.

Per eliminare la riflessione elettrica è necessario considerare l'impedenza elettrica equivalente del trasduttore, l'impedenza d'uscita ed eventualmente l'impedenza distribuita della linea. Una lamina piezoelettrica può essere rappresentata elettricamente da un risonatore RLC, come per gli oscillatori al quarzo. Lo schema elettrico equivalente di un trasduttore è mostrato in Fig.40.

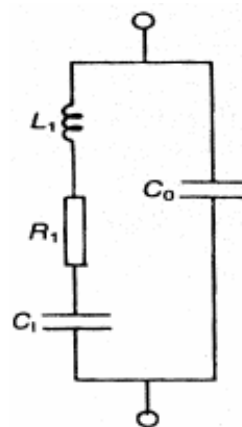


Fig. 39 Schema elettrico equivalente di un trasduttore US

Si deve inserire in prossimità del trasduttore una rete LC che provvede all'adattamento d'impedenza. Nel caso in cui si possa trascurare l'impedenza di linea, la rete LC deve avere un'impedenza d'ingresso pari al complesso coniugato dell'impedenza d'uscita dell'amplificatore RF e un'impedenza d'uscita pari al complesso coniugato dell'impedenza equivalente del trasduttore.

In dettaglio, per realizzare il circuito di matching si è deciso di utilizzare un filtro passa basso del secondo ordine il cui schema è mostrato in Fig.41. I valori di C_m e L_m dipendono dall'impedenza del

carico, cioè del trasduttore, dalla frequenza di funzionamento e dall'impedenza d'ingresso che si vuole ottenere per accoppiare il generatore di segnale.

Per calcolare i valori di capacità ed induttanza da utilizzare per la realizzazione dei circuiti si può utilizzare la seguente equazione:

$$R_g + jX_g = \left(R_t + jX_t + \frac{1}{j\omega C_m} \right) // (j\omega L_m) \quad (4.1)$$

dove le impedenze sono state esplicitate nelle loro parti reali e immaginarie; con il pedice g si intendono i valori riferiti al generatore di segnale e con il pedice t quelli riferiti al trasduttore.

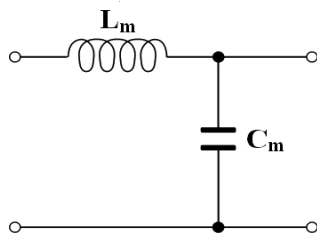


Fig. 40 Circuito passa basso del secondo ordine

I dati di impedenza elettrica equivalente dei trasduttori sono misurati dal produttore con un network analyzer e riportati sulla scheda tecnica. Per il primo set di trasduttori acquistati da Promedica Bioelectronics dalla Imasonic i valori di impedenza elettrica riportati dal costruttore e i relativi valori di C_m e L_m calcolati, tenendo conto che il generatore di segnale presenta una resistenza di uscita di 50 Ω , sono inseriti nella tabella 5.

Tabella 5

Frequenza	Impedenza elettrica [Ω]	C_m	L_m
650 kHz	579 - j585	779,0 pF	57,9 μ H
1 MHz	206 - j298	494,6 pF	27,3 μ H
2,4 MHz	55,1 - j59,2	54,6 pF	3,9 μ H
4,5 MHz	11,5 - j22,7	1016 pF	0,628 μ H

I circuiti sono stati realizzati esponendo una scheda di rame monofaccia ricoperta da uno strato di positive photoresist a raggi ultravioletti mediante un bromografo mod. AZ 210 della Mega Electronics a disposizione nel laboratorio elettro-acustico Promedica. Per tenere conto della non esatta coincidenza fra i valori di capacità e induttanza impiegati realmente nella realizzazione e quelli calcolati, a causa dei valori commercialmente disponibili e delle tolleranze, all'interno del circuito progettato è stata inserita una capacità variabile posta in parallelo alla C_m . I circuiti ottenuti sono stati in seguito inseriti in dei piccoli box forniti di connettori BNC per isolarli dagli agenti esterni.

Le board disegnate con il software di progettazione elettronica EAGLE della CadSoft Inc sono mostrate in Fig.42. Nella Fig.43 sono invece presentate le immagini delle fasi realizzative dei circuiti di matching.

La capacità variabile inserita nel circuito ha reso possibile la modifica fine delle caratteristiche di impedenza d'ingresso e di uscita. A tale scopo è stato utilizzato un vector network analyzer (VNWA) DG8SAQ prodotto da SDR-Kits (Trowbridge, UK) presente nel laboratorio elettro-acustico. Questo è un VNWA digitale che tramite una connessione USB sfrutta come interfaccia lo schermo del pc, grazie ad un opportuno software.

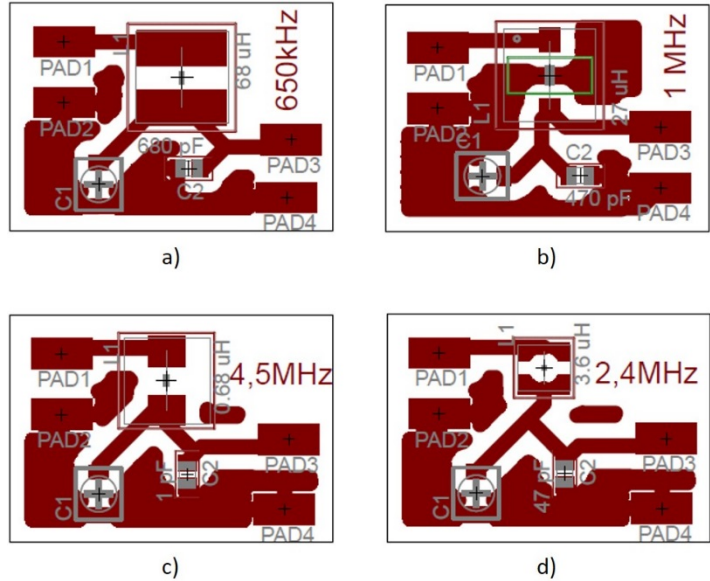


Fig. 41 Board dei circuiti di matching realizzate con CAD EAGLE.
a) 650 kHz; b) 1 MHz; c) 4,5 MHz; d) 2,4 MHz

Sono stati effettuati dei test iniziali per rilevare con un idrofono needle la pressione acustica dell'onda emessa sul piano del fuoco naturale a varie potenze elettriche. In seguito si sono modificati i parametri di ingresso e uscita dei circuiti di matching grazie all'analisi con il VNWA. Infine si sono state nuovamente effettuate le misure con l'idrofono per verificare l'effetto della modifica del circuito.

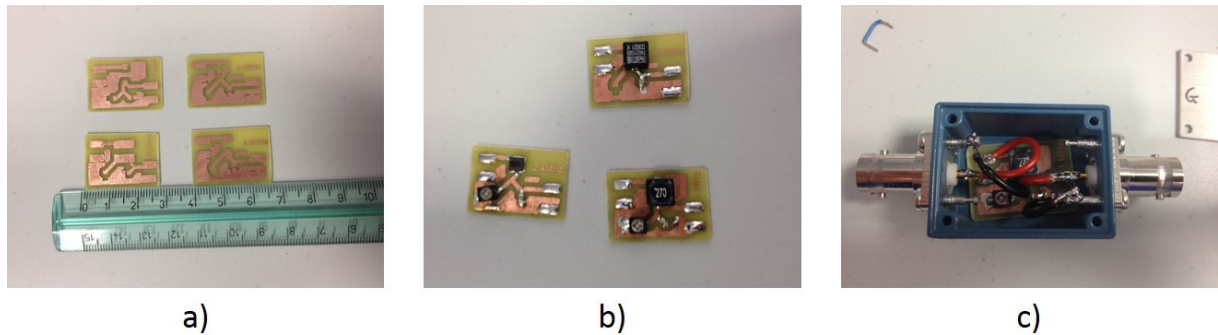


Fig. 42 Fasi realizzative dei matching box

Si è rilevato per tutti i trasduttori un miglioramento dell'efficienza di trasformazione elettro-acustica in seguito al tuning effettuato sui circuiti di matching. In Fig.44 è riportato un grafico con la pressione rilevata prima, curva in rosso, e dopo, curva in blu, l'azione sulla capacità variabile per il trasduttore da 1 MHz.

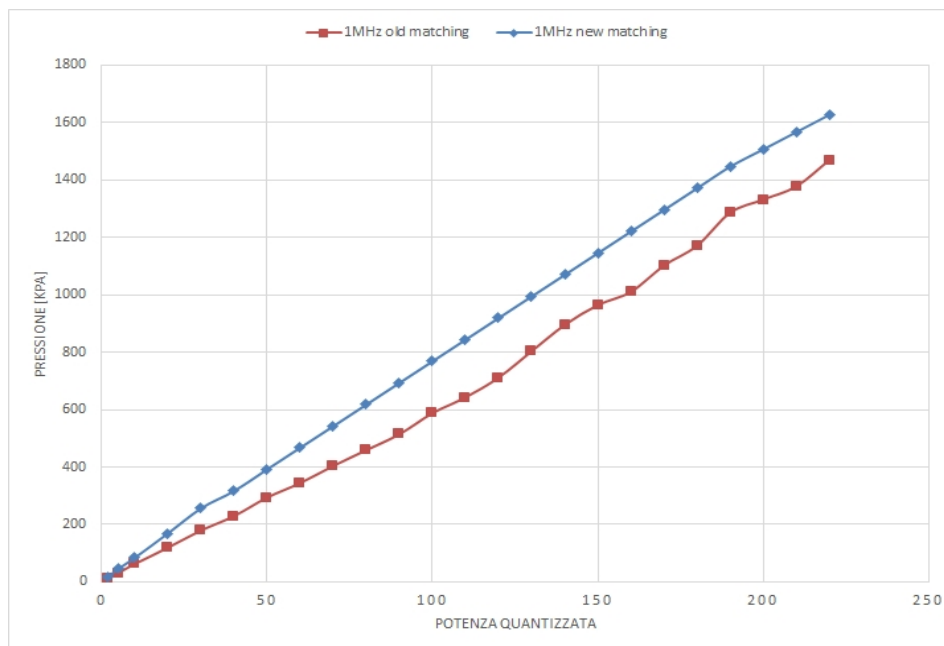


Fig. 43 Confronto tra le pressioni emesse dal trasduttore prima, in rosso, e dopo, in blu, il tuning del circuito di matching

4.4 – Sistemi di termostatazione e degassing

Nel SonoWell si scontrano due esigenze di termostatazione diverse. L'onda acustica viene creata dalla lamina piezocomposita tramite una vibrazione meccanica causando un incremento di temperatura che, se incontrollato, può causare un danneggiamento irreversibile del trasduttore. Di contro, i campioni biologici devono essere mantenuti ad una temperatura costante di 37°C per evitare shock termici che, oltre a provocare la morte cellulare, potrebbero inficiare la validità e ripetibilità degli esperimenti. Si è deciso allora di separare i due sistemi di termostatazione per progettarli secondo le diverse esigenze.

Il sistema di riscaldamento è quello che agisce sul maggior volume d'acqua, l'intero volume della vasca ad esclusione di quello occupato dal blocco dei trasduttori. È costituito da un reostato che riscalda l'acqua, un termometro che controlla che la temperatura si mantenga a 37°C e che comanda l'accensione del reostato e da un'elica.

Il sistema di raffreddamento è costituito da una pompa peristaltica da 100 ml/min che permette la circolazione dell'acqua in un circuito contenente una water block collegata ad una cella peltier da 80 W che provvede al raffreddamento del liquido. Sulla faccia calda della cella peltier è posto un dissipatore di calore metallico. Inoltre, per aumentare l'efficienza di dissipazione, è presente una ventola da 12 W. Il sistema refrigerante assicura al liquido circolante una temperatura di 10÷15°C.

Per motivi che verranno spiegati nel paragrafo seguente il liquido refrigerante non è a contatto con la superficie della lamina vibrante del trasduttore ma con la superficie laterale in acciaio del case. Per verificare che tale soluzione è sufficiente al raffreddamento sono stati condotti dei test con i trasduttori.

Le sonde realizzate dalla Imasonic possiedono una termocoppia di tipo T integrata nel case e posta in vicinanza della lamina vibrante. Sfruttando tali termocoppie è stato possibile registrare l'andamento delle temperature, mediante un datalogger OM-CP-OCTTEMP ad otto canali della OMEGA Engineering Inc. (Stamford, CT, USA), durante l'emissione di ultrasuoni. In Fig.45 è mostrato il risultato di un test di andamento di temperatura dei trasduttori da 650 kHz e 1 Mhz. In questo esempio i trasduttori hanno emesso periodicamente un campo acustico di intensità $5,5 \text{ W/cm}^2$, molto prossima al valore massimo di 5 W/cm^2 , con un duty cycle del 75% per 180 s. In queste condizioni l'innalzamento di temperatura rilevato è stato di circa 3°C .

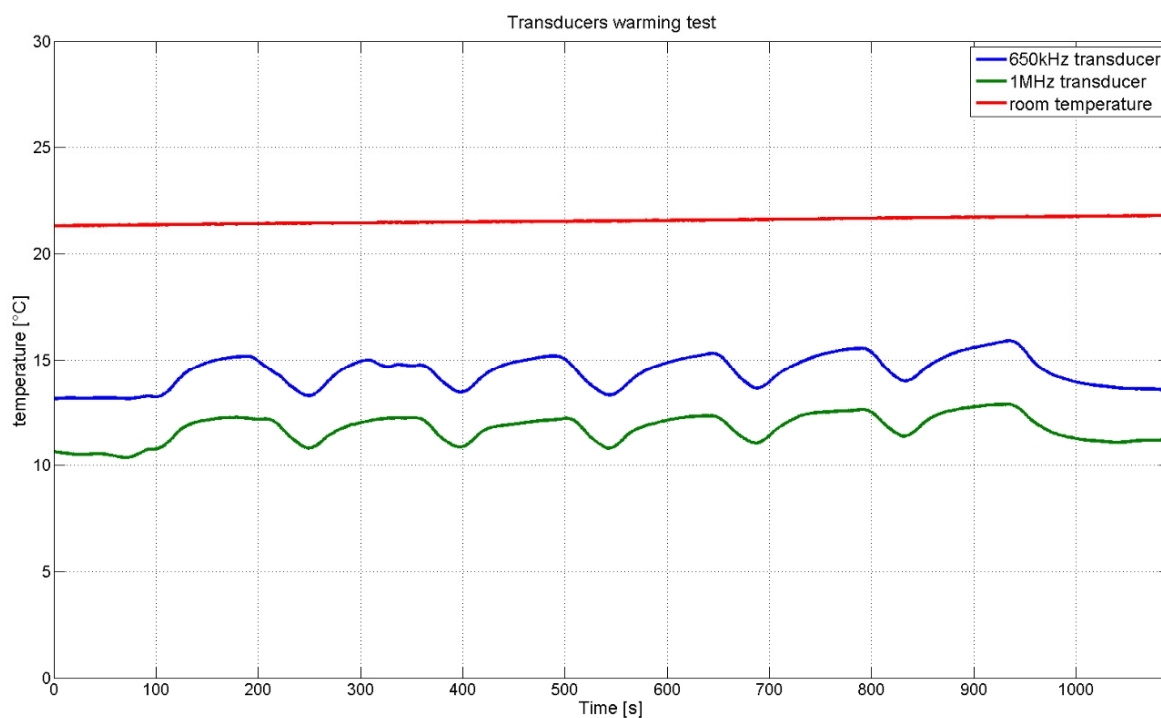


Fig. 44 Warming test dei trasduttori da 650 kHz e 1 MHz

Per evitare fenomeni di aberrazione e diffusione del fascio emesso dal trasduttore è necessario che l'onda acustica si propaghi in acqua degassata. Il liquido refrigerante, essendo a contatto solo con la superficie laterale dei trasduttori non è attraversato dagli ultrasuoni. Per tale motivo il sistema di raffreddamento non prevede il degassing.

Al contrario, l'acqua all'interno della vasca è il mezzo attraverso cui l'onda di pressione raggiunge il fondo della multiwell. Un primo accorgimento consiste nel riempire inizialmente la vasca con acqua già degassata. Per evitare che la concentrazione di gas disciolto nell'acqua aumenti durante l'utilizzo, che può durare anche diverse ore in dipendenza del numero di multiwell da processare e della durata del singolo trattamento, è stato necessario realizzare un circuito per il degassing continuo del liquido.

Tale circuito è costituito da una pompa peristaltica da 1 l/min, un filtro carbon block da 10 nm per eliminare le impurità e da un filtro online per il degassing.

In Fig.46 è mostrato l'interno del modulo di trattamento acqua del SonoWell che contiene il circuito refrigerante per i trasduttori e quello di degassing per l'acqua della vasca.

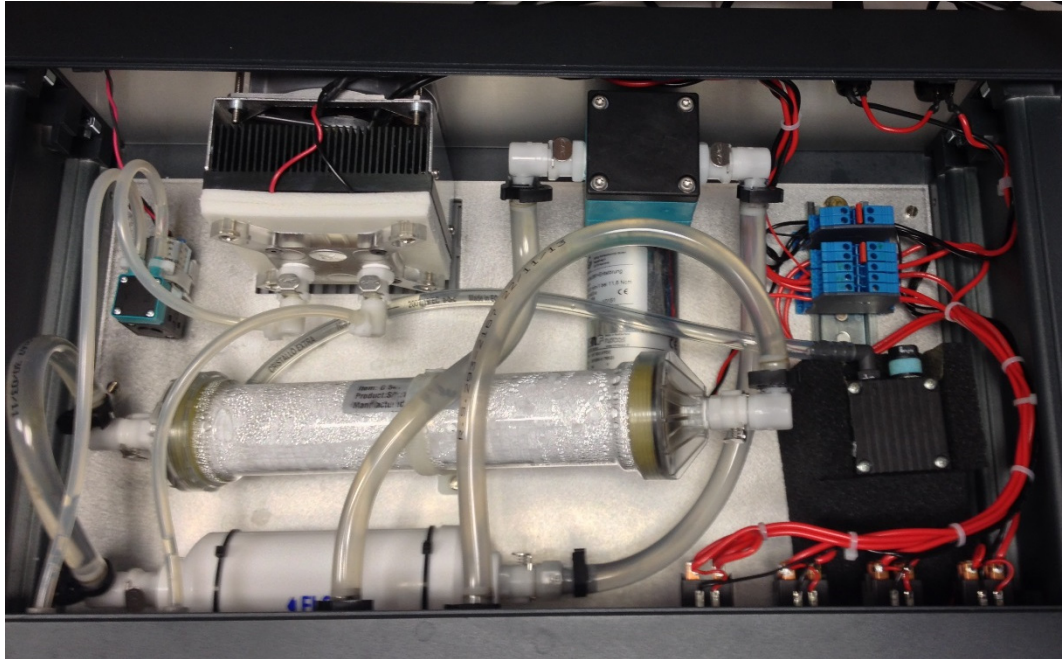


Fig. 45 Vista interna del modulo di trattamento dell'acqua del SonoWell

4.5 – Holder e throughput

In un sistema ad ultrasuoni per esperimenti cellulari è critica la scelta della posizione reciproca fra il trasduttore e il campione da sonicare.

Avendo deciso, per continuità con test effettuati con il set-up discusso nel Capitolo III, di ottimizzare la versione alfa del SonoWell per l'utilizzo con multiwell da 24 come supporto biologico le possibilità di posizionamento del trasduttore rispetto alla well sono state analizzate da Hensel et al. nel 2011 [25].

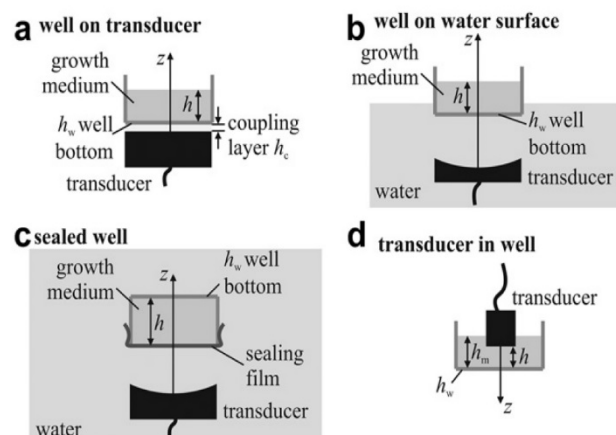


Fig. 46 Differenti soluzioni di posizionamento reciproco fra trasduttore e well: a) il trasduttore è posizionato sotto la well e l'accoppiamento è realizzato da un gel; b) la well è semisommersa in acqua ed è posizionata nel far field del campo emesso dal trasduttore; c) La well è sigillata da una pellicola e girata sottosopra in modo che il campo US non attraversi il polistirene, la well si trova nel far field; d) Il trasduttore è semisommerso nella soluzione cellulare.[25]

In dettaglio le opzioni si riducono alle quattro schematizzate nella Fig.47:

- a) il trasduttore è posizionato al di sotto del fondo della well. Non è presente acqua fra il trasduttore e la well ma l'accoppiamento è realizzato tramite un gel;
- b) la well è semisommersa in un bagno d'acqua degassata. Il trasduttore è sempre posizionato sotto il fondo della well ad una distanza tale da assicurare la sonicazione del campione con il far field del fascio ultrasonoro;
- c) la well è sigillata da una pellicola è capovolta. Il trasduttore è posizionato in maniera analoga al caso b) ma il campo non attraversa il fondo di polistirene prima di incontrare il campione;
- d) il trasduttore è posto sopra la well e semisommerso nel liquido contenente il campione cellulare.

La decisione di utilizzare quattro trasduttori a frequenze diverse rende impossibile la scelta della prima soluzione. Come già discusso nel *par.4.2.4*, dove si è discusso dei fasci ultrasonori emessi dai trasduttori, le distanze dei fuochi naturali per le quattro frequenze sono diverse e quindi risulta impossibile realizzare un accoppiamento con un gel, specialmente per il trasduttore da 4,5 MHz che possiede la distanza focale maggiore, circa 100 mm a 20°C.

Un'altra configurazione impossibile da realizzare è la d). Utilizzando campioni cellulari profondamente diversi e pericolosi, batteri e cellule staminali tumorali, immergere il trasduttore nella soluzione cellulare comporterebbe una contaminazione del case. Ne conseguirebbe che, per evitare contaminazioni fra i vari campioni sonicati e pericoli per l'operatore, si dovrebbe procedere alla sterilizzazione del trasduttore dopo ogni well. Ciò allungherebbe in maniera non accettabile i tempi di trattamento di una piastra da 24 pozzetti. Inoltre in una configurazione del genere il campione è irraggiato con il near field del campo che, come mostrato nel primo capitolo, è la zona di campo meno omogenea.

Le due soluzioni restanti sono entrambe percorribili con lo strumento progettato. Nei test finora condotti si è comunque preferita la configurazione b) a quella c). Quest'ultima, infatti, prevede l'immersione completa della multiwell capovolta. Questo, anche se comporta l'allontanamento dell'interfaccia con l'aria, che si comporta come uno specchio per l'onda acustica, ed evita le aberrazioni e lo scattering del fascio dovuti all'attraversamento del fondo di polistirene, crea dei problemi di contaminazione dell'intera vasca se la tenuta della pellicola sigillante non è perfetta. Inoltre, sigillare la well senza lasciare bolle d'aria al suo interno senza l'ausilio di un macchinario adatto è un'operazione impossibile.

Decisa la configurazione per la sonicazione della well si è dovuto affrontare il problema legato alla non coincidenza dei piani focali dei quattro trasduttori.

Per aumentare il throughput dei test e per avere un confronto diretto fra l'effetto biologico causato da onde acustiche con caratteristiche identiche ad eccezione della frequenza una peculiarità del SonoWell è quella di poter sonicare contemporaneamente quattro pozzetti differenti a diverse frequenze.

In accordo con la configurazione scelta e con le considerazioni fatte in precedenza sull'omogeneità di campo, il campione deve essere sonicato utilizzando il far field del fascio ultrasonoro. Ciò si ottiene allineando il fondo della well con il piano focale del trasduttore.

Considerando che l'onda acustica si propaga in acqua a 37°C, la velocità del suono può essere calcolata utilizzando l'equazione 3.4. Le distanze dei fuochi naturali, calcolate mediante la formula 1.38, e le divergenze, calcolate con l'equazione 1.39, dei quattro trasduttori utilizzati sono state organizzate nella tabella 6.

Tabella 6

c [m/s]	a [mm]	f [kHz]	Z _{NF} [mm]	β
1551,4	12	650	15,08	14,05
		1000	23,20	9,08
		2400	55,69	3,77
		4500	104,42	2,01

Affinché i piani focali siano tutti allineati sul fondo della multiwell si devono posizionare i quattro trasduttori a distanze diverse, con una differenza di altezza massima di 89,34 mm.

Per ottenere questo risultato è stato progettato un apposito holder a “gradini” per i trasduttori. Tale holder, oltre ad assicurare il corretto posizionamento dei trasduttori, realizza delle camere di refrigerazione attorno ai corpi delle sonde dove fare circolare il liquido refrigerante. La bontà di questa tipologia di sistema di raffreddamento è stata dimostrata nel *par.4.4*.

La prima versione dell'holder era realizzata con lastre di plexiglass di varie misure incollate con resina epossidica e i trasduttori erano fissati tramite ghiera filettate che battevano sul case, vedi Fig.48.

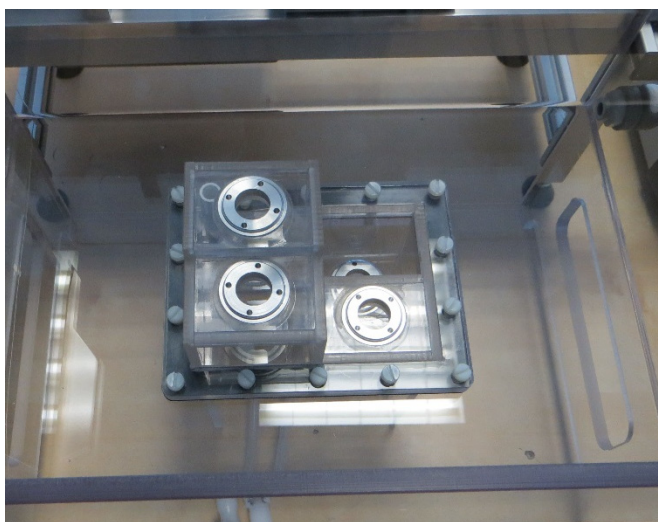


Fig. 47 Prima versione dell'holder per i trasduttori in plexiglass

In seguito tale blocco è stato migliorato e realizzato in teflon mediante un processo di stampa 3D. Una vista in prospettiva del progetto CAD del nuovo holder è mostrata in Fig.49, dove il

quadrilatero nero rappresenta il piano focale comune a tutti i trasduttori. In Fig.50, invece, è riportata una sezione dell'holder in cui si possono notare le camere di refrigerazione dei trasduttori.



Fig. 49 Visione prospettica del progetto CAD per la stampa 3D dell'holder

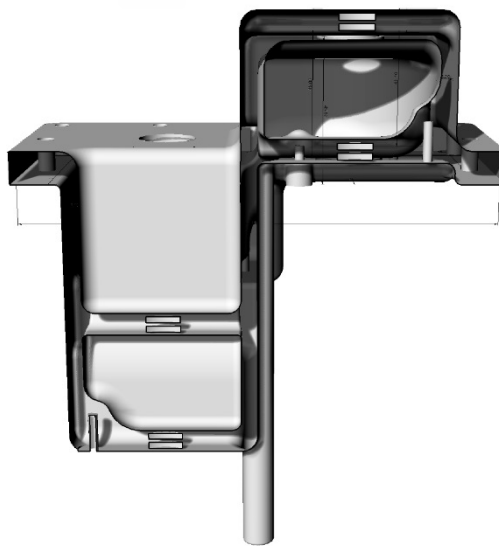


Fig. 48 Sezione del progetto CAD dell'holder che mostra le camere di refrigerazione dei trasduttori

Nel *par.4.2.1* si è giustificata la scelta della frequenza più bassa dei trasduttori pari a 650 kHz in funzione della banda del generatore di segnale impiegato. In realtà, non tenendo conto della frequenza di taglio bassa del generatore, esiste comunque un limite inferiore per la frequenza nella configurazione ottenuta con l'holder. Infatti è necessario interporre fra la lamina vibrante del trasduttore ed il fondo della well un volume d'acqua adeguato ad avere un gradiente di temperatura, dovuto al surriscaldamento

del trasduttore, che non causi un aumento di temperatura del campione biologico. Inoltre, una frequenza più bassa comporta una divergenza maggiore del fascio. Al limite questo causa l'invio di onde ultrasonore ai pozzetti adiacenti a quello di target che possono causare effetti non desiderati. Si è calcolata una frequenza minima d'impiego di 300 kHz per questa configurazione.

L'holder dei trasduttori è stato progettato anche per massimizzare il throughput dei test. Infatti le distanze fra i trasduttori sono studiate in modo da allineare i centri delle quattro sonde con i centri delle quattro well di coordinate A1, A4, C1 e C4. La posizione dei trasduttori e lo schema di una multiwell da 24 sono mostrate nella Fig.51.

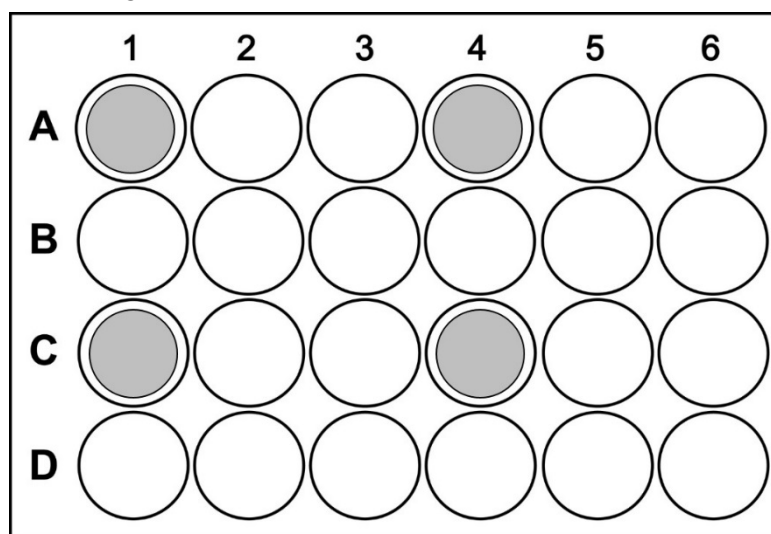


Fig. 50 Schematizzazione di una multiwell da 24 pozzetti con riferimenti coordinati, in grigio le posizioni dei trasduttori

Posizionare in tale modo i trasduttori permette di minimizzare il numero di step da eseguire per sonicare l'intera piastra. Infatti, supponendo di volere utilizzare le quattro frequenze sulla stessa piastra, è possibile sonicare tutti e 24 le well in 6 passaggi sonicando ad ogni step quattro well contemporaneamente. Ridurre il tempo di sonicazione della piastra significa minimizzare il tempo di esposizione dei campioni cellulari ad un ambiente non saturo di CO₂ come quello dell'incubatore in cui normalmente vengono accresciuti.

4.6 – Stepper Motor e driver

A prescindere dal numero di trasduttori che si desidera utilizzare per sonicare la piastra è necessario cambiare la posizione dell'holder rispetto alla piastra per allineare le well sopra il trasduttore della frequenza scelta. Nel set-up per esperimenti in vitro con il sistema MRgFUS clinico questo si realizzava muovendo fisicamente il trasduttore, grazie ai motori piezoelettrici inseriti nel cradle, o mediante uno steering elettronico. Utilizzando trasduttori a singolo elemento l'ipotesi dello steering elettronico non è percorribile. Quindi è stato necessario progettare un sistema di movimentazione robotizzata. Si è trovato

maggiormente conveniente muovere la piastra, che si trova semisommersa, che non l'holder con i trasduttori.

Il corretto allineamento fra well e trasduttore è critico. Il disallineamento può provocare riflessioni dell'onda acustica sulle superfici laterali del pozzetto e creare delle frange di interferenze costruttive o distruttive non prevedibili. Da ciò si deduce che anche la ripetibilità dei risultati sperimentali dipende dall'allineamento, per essere sicuri che le condizioni di sonicazione non cambino da un test all'altro.

Si è progettato un sistema di movimentazione 3D ad alta precisione mediante l'utilizzo di tre stepper motor montati su un frame di alluminio. I motori impiegati sono di tipo double shaft, sviluppano una coppia di 0,33 N·m e hanno uno step angolare di 1,8°.

Gli assi x e y del sistema devono avere un'escursione tale da garantire di poter sovrapporre ogni well, da A1 a D6, ad ogni trasduttore. Si è stimata una lunghezza per gli assi x e y rispettivamente in 39 cm e 25,5 cm, circa tre volte le dimensioni di una multiwell da 24. L'escursione dell'asse Z, invece, può essere meno ampia. Lo spostamento lungo tale asse serve ad effettuare aggiustamenti fini della distanza fra la piastra e la superficie dei trasduttori in modo da posizionare il piano focale dei trasduttori in corrispondenza all'inizio del target da sonicare.

Un computer comunica serialmente, tramite una connessione USB, con una scheda Arduino Mega per pilotare i motori passo-passo. La scheda Arduino è connessa ad una scheda di espansione contenente tre driver per stepper motor A4988. Tali driver utilizzano la tecnica del microstepping che, alimentando contemporaneamente le diverse fasi del motore, consente rotazioni intermedie tra un passo e l'altro. Nel sistema di motori del SonoWell è stato impostato un microstepping a mezzo passo in modo da aumentare a quattrocento i passi necessari ad effettuare un giro completo, mentre con il passo iniziale del motore di 1,8° ne erano necessari duecento. Tale tecnica permette di incrementare l'accuratezza del posizionamento della multiwell fino ad una risoluzione di 250 μ m.

4.7 – Routine di gestione del trattamento

Il sistema lavora in maniera automatica attraverso la creazione di una routine per la pianificazione del trattamento della piastra. E' possibile scrivere tale routine in tre ambienti di sviluppo differenti: Matlab, C e Python.

Il Python è un linguaggio di programmazione ad alto livello di tipo object-oriented, ha una ricca libreria built-in ed è facile da utilizzare. Inoltre è un linguaggio pseudocompilato, cioè non esiste una fase di compilazione, come in C, che genera un file .exe ma semplicemente un interprete analizza il codice sorgente e se privo di errori sintattici lo esegue. I file sorgente è un file di testo con estensione .py. Infine, sia l'utilizzo del linguaggio che il download dell'interpreter sono totalmente freeware anche per usi commerciali.

Per tali motivi è stato scelto il Python per sviluppare i codici sorgente dei test effettuati durante la mia attività di ricerca.

Il codice può essere suddiviso nelle seguenti fasi:

- inizializzazione dei canali di comunicazione, del sistema motori e del generatore; il generatore comunica con il pc tramite un collegamento ethernet;
- pianificazione sonicazioni; il sistema deve posizionare la piastra nella posizione corretta, creare una traiettoria per i fasci acustici, attendere la fine della sonicazione e passare alla sonicazione seguente ripetendo gli stessi passaggi;
- gestione delle eccezioni; un'eccezione è un esito negativo di un'operazione o un'attesa oltre il limite di una risposta durante la comunicazione con il generatore o con la scheda Arduino. In questi casi la routine invia un segnale di errore codificato ed esce;
- chiusura delle comunicazioni;

Per traiettoria dei fasci acustici, nella fase di pianificazione, si intende la definizione delle proprietà dell'onda acustica da inviare. In particolare si definisce per ogni canale di uscita la frequenza, la fase e la potenza elettrica, quantizzata in un intervallo 0-255. Per ogni traiettoria si deve indicare per quanto tempo si vuole eccitare il trasduttore, T_{ON} , ed il delay prima di un altro eventuale invio di ultrasuoni, T_{OFF} . Mediante l'inserimento di questi tempi si definisce il blocco elementare per il segnale burst tone che piloterà i trasduttori. La successiva informazione da fornire al generatore è il numero di ripetizioni del blocco elementare da inviare. In questo modo è totalmente definita la forma d'onda burst tone pilota. Il duty cycle del fascio acustico sarà dato dall'equazione:

$$DC = \frac{T_{ON}}{T_{ON} + T_{OFF}} \quad (4.2)$$

E' importante precisare che in una traiettoria è possibile definire tante triplette frequenza-fase-potenza elettrica quanti sono i canali d'uscita del generatore, cioè i valori della tripletta possono cambiare da canale a canale, ma il T_{ON} , il T_{OFF} e il numero di ripetizioni sono unici per tutti i segnali in uscita.

Il firmware del generatore e la sintassi di comunicazione sono stati sviluppati dal costruttore, la IGT. Per tale motivo non mi soffermerò sull'analisi della sintassi dei comandi da inviare al generatore per la sua gestione e per la creazione della traiettoria.

4.8 – Moduli SonoWell

Dopo aver discusso dei punti critici affrontati e delle soluzioni adottate durante la progettazione ed il seguente perfezionamento dello strumento benchtop per esperimenti in vitro, in questo paragrafo si illustrerà la struttura in moduli del sistema.

La scelta della struttura modulare permette una maggiore flessibilità dello strumento così da essere modificato ed adattato a specifiche sperimentali differenti da quelle per cui è stata ottimizzata la versione beta.

I moduli in cui è organizzato il SonoWell sono i seguenti:

- il generatore;
- il sistema di trattamento dell'acqua;
- il sistema di movimentazione 3D;
- la vasca;
- l'holder dei trasduttori;
- il terminale di controllo.

In Fig.52 è mostrata la composizione completa del sistema.



Fig. 51 Vista d'insieme dei moduli del SonoWell

Le dimensioni del blocco costituito dalla vasca, dall'holder e dal sistema di movimento robotizzato sono state ottimizzate per permetterne l'alloggiamento in una cappa sterile a flusso laminare, utilizzata comunemente in biologia per il trattamento di campioni cellulari e virali per evitare contaminazioni.

4.8.1 – Generatore

I generatori impiegati sia nella versione alfa che in quella beta sono stati forniti dalla IGT. Il primo generatore poteva gestire da quattro a sedici canali indipendentemente fornendo in uscita una potenza massima di 16 W per canale. Entrambi comunicano con il computer di controllo mediante un collegamento ethernet.

L'evoluzione del generatore installato nella versione beta ha subito una riduzione dei canali in uscita, fino a otto, ma presenta una potenza elettrica erogabile da ogni canale maggiore rispetto alla prima versione, 20 W.

Le caratteristiche di questi generatori si accordano bene all'intensità massima emessa dai trasduttori Imasonic. Qualora le necessità sperimentali richiedessero di utilizzare intensità superiori è possibile o impiegare un trasduttore focalizzato, che avendo un volume focale inferiore ai trasduttori flat produce un'intensità acustica maggiore a parità di potenza elettrica inviata, o sostituire il generatore con uno che fornisca una potenza elettrica adeguata.

4.8.2 – Sistema trattamento acqua

L'argomento della doppia termostatazione e del degassing è stato affrontato in dettaglio nel *par.4.4*. Il sistema di riscaldamento, necessario a mantenere l'acqua in cui sono semisommersi i campioni cellulari a 37°C, è affidato ad un termostato stand alone alloggiato sulla vasca di plexiglass.

Il sistema di raffreddamento, per il circuito refrigerante dei trasduttori, e quello di degassing dell'acqua, la cui struttura è stata illustrata sempre nel *par.4.4*, sono alloggiati nella stessa struttura fisica, che costituisce il modulo di trattamento dell'acqua. La vista esterna di tale modulo è mostrata in Fig.53.

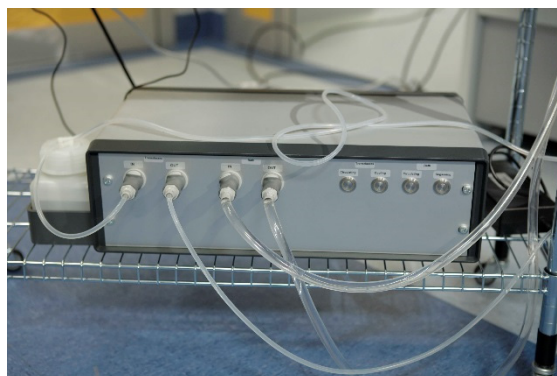


Fig. 52 Modulo raffreddamento e degassing acqua

4.8.3 – Vasca e holder

Anche se la vasca e l'holder dei trasduttori sono concettualmente due unità separabili e intercambiabili ci si può riferire ad essi come ad un unico modulo. Infatti l'holder è posizionato in un'apertura, di opportune dimensioni, ricavata sul fondo della vasca e fissato al plexiglass tramite delle viti ed una guarnizione plastica.

Dalla Fig.54 è possibile notare che la vasca ha un prolungamento per l'immersione e il supporto fisico del termostato.

La vasca può contenere circa 10 l di acqua. Le sue dimensioni sono tali da permettere la movimentazione di una multiwell da 24 in modo tale da sovrapporre ogni suo pozzetto, da A1 a D6, ad ognuno dei quattro trasduttori alloggiati nell'holder.

Per ottimizzare il sistema per la sonicazione di supporti diversi dalle multiwell, è possibile sostituire la vasca con una di dimensioni adeguate.

Come discusso nel *par.4.5* le misure e la struttura dell'holder sono stati definiti in modo da allineare i piani focali dei trasduttori con le frequenze scelte, aumentare il throughput sperimentale e ricavare delle camere di raffreddamento attorno alle superfici laterali delle sonde US.

Se ne deduce che cambiare la frequenza o le dimensioni fisiche anche di un solo trasduttore comporta la modifica dell'intera struttura del supporto. Il progetto CAD dell'holder è stato realizzato con la consapevolezza di tale problema ed è stato organizzato in una struttura quotata rispetto al centro dei trasduttori, le distanze reciproche e la distanza dal piano focale. In tal modo il progetto si modifica in automatico e semplice cambiando le dimensioni caratteristiche dei trasduttori.

In Fig. 55 un dettaglio di un trattamento. Si può notare la multiwell semisommersa posizionata al di sopra dell'holder all'interno della vasca.

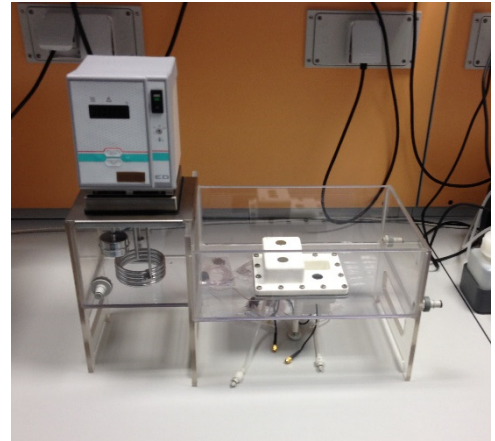


Fig. 53 Vasca, holder trasduttori e termostato

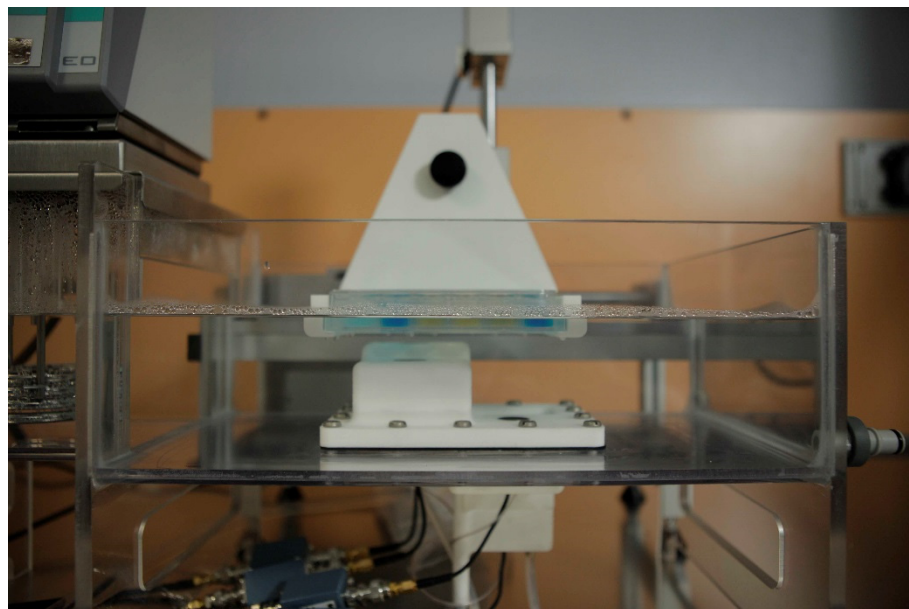


Fig. 54 Dettaglio di un trattamento su multiwell da 24

4.8.4 – Terminale di controllo

Per gestire il sistema è necessario un computer, laptop o desktop, che esegua il codice sorgente della pianificazione del trattamento e che possa comunicare serialmente con il generatore e con la scheda Arduino di controllo del sistema di stepper motor.

La scelta di utilizzare per la stesura del codice sorgente il linguaggio di programmazione Python permette di gestire il SonoWell con sistemi operativi differenti in cui sia installato l'interprete Python, disponibili per piattaforme iOS, Microsoft Windows e GNU/Linux.

Bibliografia

- [1] Gourevich, D., Gerold, B., Arditti, F., Xu, D., Liu, D., Volovick, A., ... & Cochran, S. (2012). Ultrasound activated nano-encapsulated targeted drug delivery and tumour cell poration. *Advances in experimental medicine and biology*, 733, 135-144.
- [2] Durst, C., Monteith, S., Sheehan, J., Moldovan, K., Snell, J., Eames, M., ... & Wintermark, M. (2013). Optimal Imaging of In Vitro Clot Sonothrombolysis by MR-Guided Focused Ultrasound. *Journal of Neuroimaging*, 23(2), 187-191.
- [3] Barbato G., Catallo N., Corso C., Scoarughi G.L. & Dumont E.. WO2015/110955 A1, PCT patent, international publication date 30 July 2015.
- [4] Fechheimer, M., Boylan, J. F., Parker, S., Siskin, J. E., Patel, G. L., & Zimmer, S. G. (1987). Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23), 8463-8467.
- [5] Kim, H. J., Greenleaf, J. F., Kinnick, R. R., Bronk, J. T., & Bolander, M. E. (1996). Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Human gene therapy*, 7(11), 1339-1346.
- [6] Kodama, T., Tomita, Y., Koshiyama, K. I., & Blomley, M. J. (2006). Transfection effect of microbubbles on cells in superposed ultrasound waves and behavior of cavitation bubble. *Ultrasound in medicine & biology*, 32(6), 905-914.
- [7] Endo-Takahashi, Y., Negishi, Y., Kato, Y., Suzuki, R., Maruyama, K., & Aramaki, Y. (2012). Efficient siRNA delivery using novel siRNA-loaded Bubble liposomes and ultrasound. *International journal of pharmaceutics*, 422(1), 504-509.
- [8] Ghoshal, G., Swat, S., & Oelze, M. L. (2012). Synergistic effects of ultrasound-activated microbubbles and doxorubicin on short-term survival of mouse mammary tumor cells. *Ultrasonic imaging*, 34(1), 15-22.
- [9] Kim, Y. S., Rubio, V., Qi, J., Xia, R., Shi, Z. Z., Peterson, L., ... & O'Neill, B. E. (2011). Cancer treatment using an optically inert Rose Bengal derivative combined with pulsed focused ultrasound. *Journal of Controlled Release*, 156(3), 315-322.
- [10] Pitt, W. G., McBride, M. O., Lunceford, J. K., Roper, R. J., & Sagers, R. D. (1994). Ultrasonic enhancement of antibiotic action on gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(11), 2577-2582.
- [11] Qian, Z., Sagers, R. D., & Pitt, W. G. (1999). Investigation of the mechanism of the bioacoustic effect. *Journal of biomedical materials research*, 44(2), 198-205.
- [12] Pitt, W. G., & Ross, S. A. (2003). Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnology progress*, 19(3), 1038-1044.
- [13] Kim, J. R., Oh, S. H., Kwon, G. B., Namgung, U., Song, K. S., Jeon, B. H., & Lee, J. H. (2013). Acceleration of peripheral nerve regeneration through asymmetrically porous nerve guide

- conduit applied with biological/physical stimulation. *Tissue Engineering Part A*, 19(23-24), 2674-2685.
- [14]Nagata, K., Nakamura, T., Fujihara, S., & Tanaka, E. (2013). Ultrasound modulates the inflammatory response and promotes muscle regeneration in injured muscles. *Annals of biomedical engineering*, 41(6), 1095-1105.
- [15]Fung, C. H., Cheung, W. H., Pounder, N. M., de Ana, F. J., Harrison, A., & Leung, K. S. (2014). Investigation of rat bone fracture healing using pulsed 1.5 MHz, 30mW/cm² burst ultrasound—Axial distance dependency. *Ultrasonics*, 54(3), 850-859.
- [16]Wright, C. C., Hynynen, K., & Goertz, D. E. (2012). Pulsed focused ultrasound-induced displacements in confined in vitro blood clots. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, 59(3), 842-851.
- [17]Zhang, S., Cheng, J., & Qin, Y. X. (2012). Mechanobiological modulation of cytoskeleton and calcium influx in osteoblastic cells by short-term focused acoustic radiation force.
- [18]Xu, J., Bigelow, T. A., Halverson, L. J., Middendorf, J. M., & Rusk, B. (2012). Minimization of treatment time for in vitro 1.1 MHz destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by high-intensity focused ultrasound. *Ultrasonics*, 52(5), 668-675.
- [19]Bigelow, T. A., Northagen, T., Hill, T. M., & Sailer, F. C. (2009). The destruction of *Escherichia coli* biofilms using high-intensity focused ultrasound. *Ultrasound in medicine & biology*, 35(6), 1026-1031.
- [20]Jensen, J. A. (1991). A model for the propagation and scattering of ultrasound in tissue. *Acoustical Society of America. Journal*, 89(1), 182-190.
- [21]Jensen, J. A., & Svendsen, N. B. (1992). Calculation of pressure fields from arbitrarily shaped, apodized, and excited ultrasound transducers. *Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, IEEE Transactions on*, 39(2), 262-267.
- [22]Tupholme, G. E. (1969). Generation of acoustic pulses by baffled plane pistons. *Mathematika*, 16(02), 209-224.
- [23]Stepanishen, P. R. (1971). The Time-Dependent Force and Radiation Impedance on a Piston in a Rigid Infinite Planar Baffle. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 49(3B), 841-849.
- [24]Stepanishen, P. R. (1971). Transient radiation from pistons in an infinite planar baffle. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 49(5B), 1629-1638.
- [25]Hensel, K., Mienkine, M. P., & Schmitz, G. (2011). Analysis of ultrasound fields in cell culture wells for in vitro ultrasound therapy experiments. *Ultrasound in medicine & biology*, 37(12), 2105-2115.

Capitolo V – Risultati di rilevazione temperatura e fenomeni cavitativi

In questo capitolo si riporteranno i risultati relativi a test effettuati sul Sonowell. In particolare, nella prima parte si presenteranno i grafici di temperatura rilevati all'interno delle well durante dei test di sonicazione.

Nella seconda parte del presente capitolo si spiegherà in cosa consiste il fenomeno cavitativo, quali sono le dinamiche che ne causano l'innesco e quali sono gli effetti. Si analizzeranno i metodi presenti in letteratura per rilevare l'entità della cavitazione e mediante l'analisi di spettri acquisiti sperimentalmente si presenterà un nuovo algoritmo per ricavare un indice di cavitazione.

5.1 – Rilevazione temperatura

Sono stati condotti dei test per verificare l'andamento della temperatura all'interno della soluzione cellulare. Poiché il terreno di coltura delle cellule è a base acquosa le proprietà di capacità e diffusione termica della soluzione saranno molto prossime a quella dell'acqua pura. Per tale motivo, durante le misure, la soluzione cellulare è stata sostituita da acqua degassata per evitare contaminazioni.

Si è deciso di rilevare la temperatura in tre punti della well a diversa distanza dal centro e dal fondo. Le misure sono state ripetute su sei pozzetti della stessa multiwell. La temperatura è stata rilevata tramite tre termocoppie di tipo T collegate al datalogger OM-CP-OCTTEMP ad otto canali della OMEGA Engineering Inc. Una di esse è stata posta al centro del pozzetto a 4 mm dal fondo, le altre due sono state posizionate simmetricamente rispetto al centro rispettivamente a 2 mm e a 6 mm dal fondo della well. Lo schema della sezione del set-up di misura è mostrato nella Fig.56a.

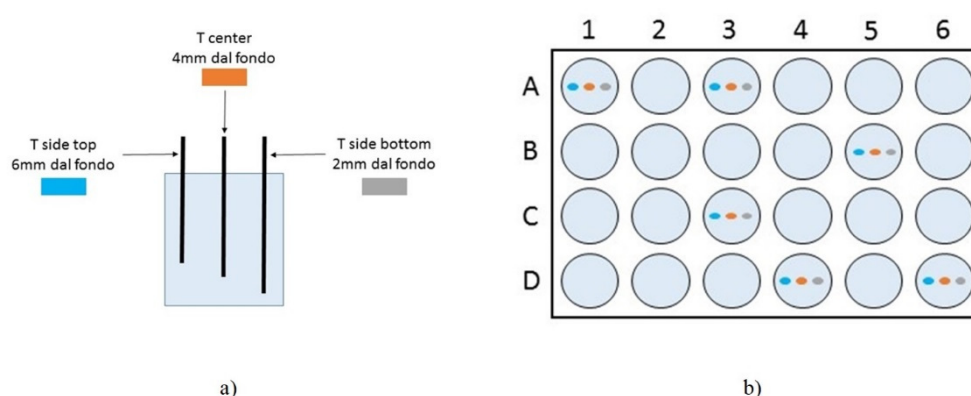


Fig. 55 Schematizzazione set-up misura; a) posizionamento termocoppie all'interno della well; b) pozzetti esaminati e disposizione termocoppie

Le sei well esaminate e la posizione delle tre termocoppie all'interno di ogni pozzetto sono schematizzate in Fig.56b.

I pozzetti sono stati sonicati con un fascio a frequenza 1,05 MHz con una pressione di picco di 1,17 MPa per cinque minuti. La pressione e il tempo sono stati volutamente impostati ad un valore alto per esasperare l'aumento di temperatura.

Per evitare la riflessione dell'onda all'interfaccia aria-acqua è stato posizionato un materiale anecoico fonoassorbente sopra il pozzetto da sonicare che funge anche da supporto meccanico per le tre termocoppie, come mostrato in Fig.57.

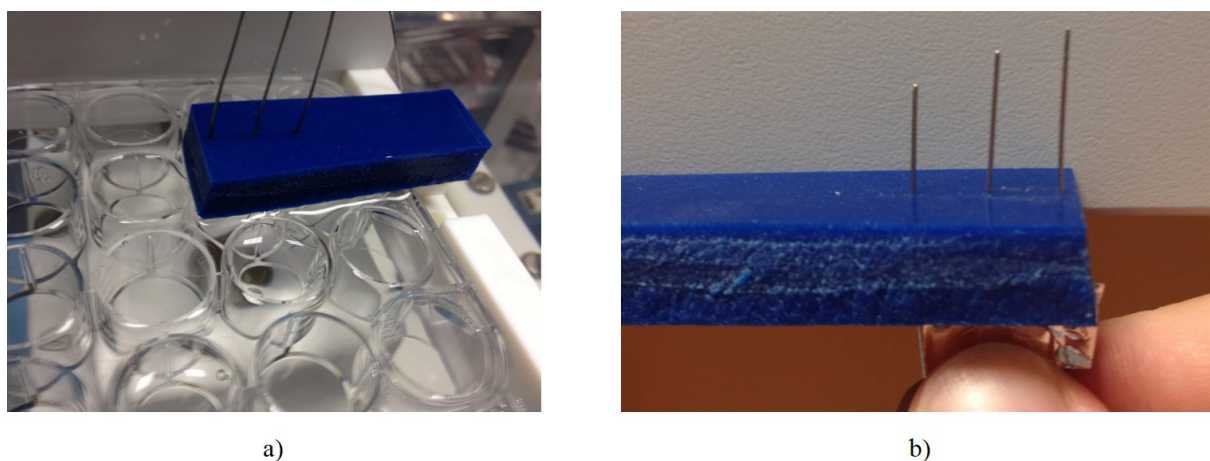


Fig. 56 a) posizionamento materiale fonoassorbente all'interfaccia aria-acqua; b) punte termocoppie sostenute dal fonoassorbente

Si è scelto di effettuare due set di misure con le caratteristiche del segnale di pilotaggio più frequentemente utilizzate durante i test in vitro eseguiti. In entrambi i set il segnale è stato di tipo burst tone con un repetition time di 400 ms. Nel primo si è impostato un valore di duty cycle pari al 25%, nel secondo pari al 40%.

In tutte le misure, com'era prevedibile, si è riscontrato un surriscaldamento maggiore quando è stato impiegato il duty cycle al 40%.

I diagrammi riportanti i valori di temperatura rilevata sono mostrati in Fig.58. I diagrammi sono organizzati per duty cycle e per termocoppia. In ogni diagramma sono presenti le sei curve di surriscaldamento e successivo raffreddamento relative ai pozzetti in esame per un confronto diretto a parità di posizione della termocoppia all'interno della well e di stimolazione ultrasonora.

In generale le temperature più alte sono state registrate nei pozzetti della riga D, D4 e D6. Per tali well, la differenza di temperatura rispetto ai valori rilevati negli stessi punti degli altri pozzetti varia fra un minimo di 3°C ad un massimo di 5°C. Ad esclusione di queste due well, le curve di temperatura giacciono in una fascia di 3°C.

Queste misure sono state validate dall'analisi dei dati sperimentali biologici che hanno rivelato un maggiore effetto del trattamento US quando i campioni sono posti nella riga D della multiwell.



Fig. 57 Grafici delle temperature rilevate dalla termocoppie; sulla sinistra sono mostrati i risultati ottenuti con il 40% di duty cycle, sulla destra i valori delle stesse termocoppie con il 25% di duty cycle

Si sono ipotizzate due possibili cause per il delta di temperatura provocato solo sulla riga D rispetto alle altre:

- Un disallineamento del fondo della multiwell rispetto al piano focale dei trasduttori; ciò può essere dovuto ad un'inclinazione leggera del supporto per la piastra montata sul sistema di motori, o di tutto il blocco motori, rispetto al piano della vasca; spostando la piastra per sonicare la riga D si potrebbe accentuare l'angolo di disallineamento fino a provocare aberrazioni del fascio ultrasonoro durante l'attraversamento del fondo in polistirene;
- Una non precisa valutazione delle distanze fra i centri delle well lungo le righe; tale errore porterebbe ad un non allineamento perfetto del trasduttore con il pozzetto dopo uno spostamento da una riga all'altra; l'effetto di disallineamento maggiore, dovuto a tre shift non calibrati, si avrebbe sulla riga D.

In entrambe le ipotesi, però, l'effetto dovrebbe essere graduale, e quindi crescente lungo le righe, ciò non si riscontra analizzando i grafici.

5.2 – Cavitazione

La cavitazione è la formazione di zone di vapore all'interno di un fluido o tessuto. Ciò avviene a causa di un abbassamento locale di pressione, dovuto nel nostro caso al passaggio dell'onda di pressione ultrasonica, che raggiunge la tensione di vapore del liquido, provocandone così un cambiamento di fase formando bolle contenenti vapore.

La dinamica del processo è simile a quella dell'ebollizione. La principale differenza tra cavitazione ed ebollizione è che nell'ebollizione, a causa dell'aumento di temperatura, la tensione di vapore sale fino a superare la pressione del liquido, creando quindi una bolla meccanicamente stabile, perché piena di vapore alla stessa pressione del liquido circostante; nella cavitazione invece è la pressione del liquido a scendere improvvisamente, mentre la temperatura e la tensione di vapore restano costanti. Per questo motivo la "bolla" da cavitazione resiste solo finché non esce dalla zona di bassa pressione idrostatica; appena ritorna in una zona del fluido in quiete, la pressione di vapore non è sufficiente a contrastare la pressione idrostatica e la bolla da cavitazione implode immediatamente.

In un fluido attraversato da ultrasuoni si possono distinguere due tipologie di cavitazione:

- cavitazione stabile o non inerziale: il diametro della microbolla subisce oscillazioni cicliche in rapporto alle variazioni della pressione dell'onda acustica senza implodere o esplodere. In prossimità delle bolle le forze cinetiche indotte dagli US sono potenziate e la superficie esterna delle bolle presenta differenze di potenziale elettrico che possono indurre ossidazione, riduzione, formazione di radicali liberi;

- cavitazione instabile o inerziale: una intensità acustica sufficiente può causare un'espansione della bolla tale da indurle la repentina contrazione e rottura, con liberazione violenta di energia cinetica e conseguente ionizzazione e formazione di radicali liberi nelle strutture vicine.

Ad entrambe le tipologie di cavitazione si associa un aumento locale della temperatura dovuto all'attrito viscoso, alla re-irradiazione acustica e alla conduzione termica; ma nel caso di cavitazione inerziale è presente e predominante l'effetto dovuto al collasso della microbolla. Tale collasso è asimmetrico, Fig.59, e genera un microjet nel fluido con una velocità che può raggiungere i 1000 m/s [1]. Il collasso produce anche un significativo aumento di pressione e temperatura (>1000°C) localizzate al centro della bolla [2].

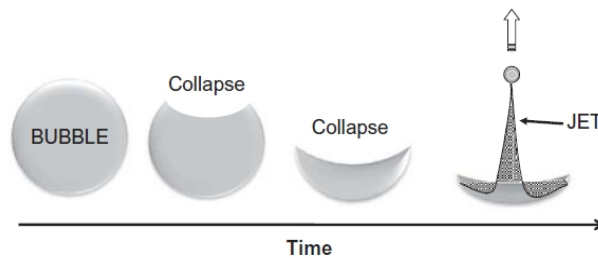


Fig. 58 Schematizzazione del collasso asimmetrico di una bolla durante la cavitazione inerziale [3]

La probabilità che si possano innescare fenomeni cavitati in un mezzo attraversato da un'onda acustica è legata al picco di pressione negativa e alla frequenza dell'onda [4].

Si definisce un mechanical index (Mi) che lega queste due caratteristiche dell'onda:

$$Mi = \frac{P_{-max}}{\sqrt{f}} \quad (5.1)$$

dove P_{-max} è il picco di pressione negativa dell'onda espresso in megapascal ed f è la frequenza dell'onda in megahertz.

Se è verificata la condizione $Mi < 0,7$, il fascio ultrasonoro non causa fenomeni cavitativi neanche attraversando un mezzo contenente bolle [3].

5.2.1 – Problematiche relative alla cavitazione

Benché la cavitazione sia utilizzata in applicazioni biomediche, ad esempio per la shock wave lithotripsy [5][6] ed in alcuni studi sulla sonoporazione [7][8], è un fenomeno difficile da controllare. Infatti, la cavitazione inerziale scatena un effetto a catena di portata non prevedibile.

Negli studi di irradiazione di ultrasuoni su colture cellulari gli effetti biologici possono essere provocati o dallo stress meccanico dovuto al passaggio dell'onda di pressione ultrasonora o dall'effetto termico dovuto all'aumento di temperatura legato al passaggio dell'onda.

Il SonoWell, permette di variare tutti i parametri dell'onda ultrasonora. Supponendo che tali parametri siano settati in modo da non indurre un innalzamento eccessivo della temperatura nel mezzo, cioè per rilevare solo gli effetti biologici dovuti allo stress meccanico, se si venissero a creare le condizioni per avere cavitazione nel terreno di coltura si otterrebbe un innalzamento di temperatura non rilevabile e non controllabile. Inoltre, tale fenomeno, potrebbe favorire degli effetti non attribuibili al solo stress meccanico che inficerebbero l'esito degli esperimenti.

5.2.2 – Rilevazione del fenomeno

Il metodo principale per rilevare la presenza di cavitazione sfrutta le proprietà fisiche dei materiali piezoelettrici. E' possibile, mediante un trasduttore utilizzato come ricevitore [9] o con un needle hydrophone [10] posizionati ortogonalmente rispetto alla direzione di propagazione dell'onda ultrasonora, rilevare le onde di pressione che si propagano nel mezzo. Lo spettro di tali onde presenterà dei picchi in corrispondenza della frequenza fondamentale dell'onda ultrasonora e delle sue armoniche. Il posizionamento ortogonale permette di minimizzare la ricezione dell'onda ultrasonora che provoca la cavitazione.

In presenza di cavitazione non inerziale le microbolle oscillano stabilmente ad una frequenza dipendente dalle dimensioni fisiche della bolla; i picchi relativi alla frequenza fondamentale e alle sue armoniche sono amplificati e si registra la creazione di picchi in corrispondenza delle subarmoniche della fondamentale [11].

Una bolla in fase di collasso, effetto associato alla cavitazione inerziale, non oscillando periodicamente non produce un'onda sonora ad una sola frequenza, per tale motivo la cavitazione inerziale causa nello spettro un rumore a larga banda [10].

Un dispositivo che migliora la rilevazione della cavitazione è composto da una superficie cilindrica piezoelettrica protetta esternamente da un materiale assorbente nella frequenza degli ultrasuoni [12][13]. Posizionando tale dispositivo con l'asse cilindrico perpendicolare alla direzione di propagazione dell'onda emessa dal trasduttore, il segnale rilevato è unicamente costituito dalle onde sonore emesse a causa della cavitazione.

Nei set-up per esperimenti in vitro non sempre è possibile utilizzare un detector fra quelli su esposti per mancanza di spazi. Per tale motivo in letteratura esistono metodi che usano le proprietà chimiche di alcuni composti. In particolare si sfrutta la creazione di radicali OH in presenza di cavitazione.

Ad esempio, gli anioni di tereftalato (TA) non sono fluorescenti, ma in presenza di radicali OH si combinano per creare una molecola fluorescente, gli anioni di idrossitereftalato (HTA). Aggiungendo determinate concentrazioni di TA in un liquido e in seguito sottoponendolo agli ultrasuoni un'analisi della fluorescenza della soluzione può dare informazioni sulla entità della cavitazione avvenuta [9][10].

5.2.3 – Indici di cavitazione in letteratura

Diversi lavori presenti in letteratura hanno definito degli indici per quantificare l'entità della cavitazione inerziale. In questo paragrafo analizzerò i lavori più importanti illustrando le modalità di calcolo dell'indice e i punti critici rilevati.

Un lavoro citato da tutti coloro che si sono occupati di cavitazione è quello pubblicato nel 2000 da Frohly et al. [11]. Per ricavare un parametro legato all'entità della cavitazione inerziale, e quindi legata al rumore bianco, si integra tutto lo spettro rilevato con un idrofono needle durante la sonicazione di acqua di rubinetto a temperatura ambiente. Le intensità utilizzate vanno da 12 a 300mW/cm². Il nome assegnato a tale parametro è cavitation noise power (CNP). Per dimostrare come il contributo del rumore di cavitazione al CNP sia prevalente rispetto ai picchi armonici si integrano gli spettri ottenuti tagliandoli superiormente a 30 dB, valore massimo registrato per il rumore bianco. Supponendo che la differenza fra i CNP e gli integrali degli spettri tagliati rappresenti il contributo dei picchi spettrali al CNP stesso, si dimostra come tale contributo sia inferiore al 10%. I punti deboli di tale lavoro sono due:

- a) il campione è tenuto a temperatura ambiente; la temperatura influenza i parametri fisici del mezzo, tra cui anche la velocità del suono secondo l'equazione 3.4, e quindi variano le condizioni sperimentali;
- b) la stima a 30dB penalizza troppo i segnali armonici quando l'intensità acustica è minore di 120mW/cm² e quindi sovrastima il peso del noise in questi casi.

Sabraoui et al., nel 2011 hanno pubblicato un lavoro in cui illustrano un sistema per mantenere costante il livello di cavitazione durante una sonicazione [14]. Per fare ciò hanno usato una rilevazione real time dell'entità della cavitazione grazie all'analisi dello spettro del segnale prodotto da un idrofono in PVdF per modulare la potenza emessa da un trasduttore da 445 kHz. Il segnale in uscita dall'idrofono è stato amplificato di 20dB, digitalizzato e processato con Labview. Per quantificare l'entità della cavitazione è stato definito un cavitation index (CI). Tale indice si ricava considerando lo spettro del segnale prodotto dall'idrofono nell'intervallo 0.1-7.1 MHz, facendone il valore medio e sottraendo il rumore misurato acquisendo il segnale in assenza di eccitazione del trasduttore. Per validare la bontà dell'indice definito è stato utilizzato l'acido tereftalico. Nel caso di loop aperto, cioè in assenza di modulazione della potenza del trasduttore, non si riesce a trovare un legame diretto fra l'intensità ed il livello di fluorescenza ottenuto. Dalle caratteristiche del trasduttore, 445 kHz e 20 mm di diametro, si ricava che il piano focale è a 30mm; la distanza tra la superficie attiva del trasduttore e l'interfaccia aria-acqua è appena 14mm. Ciò significa che il campione è sonicato utilizzando il near field del campo. Per minimizzare la riflessione all'interfaccia con l'aria la distanza di 14 mm è scelta perché coincide con uno zero del campo emesso, Fig.8. Ma la temperatura del campione durante le misure è compresa fra 15°C e 23°C. Tale variabilità della temperatura non assicura sempre la coincidenza dell'interfaccia con lo zero del campo ultrasonoro.

Il CI definito da Sbraoui et al. è anche utilizzato in due lavori successivi del 2014 [15] e del 2015 [16].

A differenza dei lavori appena discussi, Somaglino et al. nel 2011 [10] definirono un indice di cavitazione, la cavitation dose (CD), analizzando il segnale nel dominio del tempo prelevato da un needle hydrophone con tip da 1,5mm. E' stato utilizzato un trasduttore focalizzato da 1,13 MHz con diametro 50 mm per sonicare una soluzione contenuta in una pipetta di polietilene posizionando l'idrofono all'interno della pipetta a 90° rispetto alla direzione di propagazione del fascio ultrasonoro. La CD è misurata considerando solo il segnale tra la frequenza fondamentale e la prima armonica filtrando il segnale in uscita dall'idrofono fra 1,24 e 2,17 MHz. Con tale banda si eliminano anche i picchi della fondamentale e della prima armonica, ma anche le eventuali subarmoniche che potrebbero crearsi a causa della cavitazione non inerziale [11]. Dal segnale filtrato, ed in seguito amplificato, viene estratto l'involuppo $s(t)$. La cavitation dose è l'integrale nel tempo di tale involuppo. Per validare la CD gli autori hanno utilizzato come riferimento la dosimetria con HTA per rilevare la cavitazione secondo le misure fatte da Villeneuve et al. [9]. Non è ben giustificata la scelta di considerare solo il rumore fra la fondamentale e la prima armonica: ad esempio un lavoro di Chen et al. del 2003 ricava un indice di cavitazione considerando il segnale nella finestra di frequenza fra la terza e la quarta armonica [17]. La dispersione della lettura con HTA aumenta con la CD e l'andamento lineare ricavato sembra molto forzato. Infine anche in questo caso le condizioni sperimentali non sono mantenute costanti, bensì riportano variazioni di temperatura, pressione, gas disciolto in acqua e impurità nel TA. In particolare, le temperature variano fra i 23°C e i 28°C.

Nel 2014 Li et al. pubblicarono uno studio diverso dai precedenti poiché utilizzarono come target non una soluzione acquosa bensì gel che riproducono le caratteristiche dei tessuti (polyacrylamide e un gel di agarosio), tessuti espantati e modelli animali [18]. Il trasduttore utilizzato è focalizzato e con una frequenza pari a 1,1 MHz. Tale trasduttore presenta un buco centrale di 38 mm in cui si posizionano un passive cavitation detector (PCD) in PVDF anulare focalizzato e una sonda per imaging ecografico. I fuochi del trasduttore e del PCD sono allineati e sovrapposti. La sonicazione dei campioni dura 60 secondi e avviene tramite impulsi da 1 ms, con 1 Hz di pulse repetition frequency. La breve durata dell'impulso e il basso duty cycle, 0,1%, prevengono il surriscaldamento del campione, il cui ΔT è calcolato teoricamente nell'articolo. Le potenze utilizzate vanno da 15 a 800 W, che in termini di picco negativo di pressione, rilevato con un hydrophone a fibra ottica, si traduce in un intervallo 1,6-12,4 MPa. Il segnale prelevato dal PCD viene amplificato e filtrato fra 2,3 e 8,8MHz per eliminare la fondamentale e la prima armonica, in seguito si usa un filtro comb notch con banda 100kHz per eliminare le armoniche, le subarmoniche e le superarmoniche e poi viene analizzato nel dominio del tempo. Per discriminare se il segnale letto è dovuto a rumore o ad un evento cavitativo si considera il ritardo; cioè, se il segnale prelevato dal PCD subisce un aumento immediato è considerato rumore, se l'aumento è registrato dopo

un tempo pari a quello necessario all'onda per raggiungere il target e tornare indietro allora è associato ad un evento cavitativo. Per valutare l'entità del fenomeno cavitativo viene definito il broad-band noise amplitude come valore quadratico medio del segnale prelevato dal PCD e filtrato come illustrato sopra.

5.2.4 – Misure spettrali e nuovo indice di cavitazione

Dall'analisi della letteratura effettuata nel paragrafo precedente sono arrivato alla conclusione che è possibile ottenere un nuovo indice di cavitazione più puntuale e robusto rispetto a quelli riportati.

Per ottenere ciò si sono eseguiti una serie di test per rilevare lo spettro emesso durante la sonicazione di un campione liquido contenente una quantità di gas disciolto variabile.

Durante la sonicazione il campione è stato posto in una flask da 250 ml in polistirene per uso biologico e immerso in acqua degassata. La temperatura dell'acqua degassata e del campione è stata mantenuta ad un valore costante di 28°C, mediante un termostato, durante tutte le misure.

Per rilevare il segnale da analizzare è stato usato un needle hydrophone della pa con tip da 0,5 mm posto all'interno della flask a 90° rispetto alla direzione di propagazione del fascio e ad una distanza dal trasduttore pari a quella del fuoco naturale. Il segnale prodotto dall'idrofono è stato digitalizzato mediante un oscilloscopio digitale picoscope 3204A della Pico Technology ad 8 bit utilizzato in modalità analizzatore di spettro.

Si è scelto di indagare sugli effetti cavitativi provocati da due frequenze: 650 kHz e 1 MHz. I test sono stati effettuati a parità di picco negativo di pressione. Nella tabella 7 sono riportati i valori di pressione testati ed i relativi mechanical index per le due frequenze.

Tabella 7

	0.75MPa	0.80MPa	0.84MPa	0.88MPa	0.91MPa	0.95MPa
650 kHz	0.92	0.99	1.04	1.09	1.12	1.17
1 MHz	0.75	0.80	0.84	0.88	0.91	0.95

Le frequenze più alte, 2,4 MHz e 4,5 MHz, alle pressioni scelte presentano degli M_i al di sotto della soglia di 0,7 e quindi non è stato ritenuto utile impiegarli nei test.

La cavitazione, oltre alle caratteristiche dell'onda ultrasonora, dipende dalla concentrazione di gas disciolto nel liquido e dalle dimensioni delle bolle create. Per tale motivo si è scelto di ripetere lo stesso set di rilevazioni per soluzioni contenenti diverse concentrazioni di gas.

Al fine di generare gas nei campioni si è creata una soluzione di acqua degassata, sodio bicarbonato (NaHCO_3) e acido acetico (CH_3COOH). Questi ultimi due composti reagendo producono CO_2 in forma gassosa.

In particolare si sono usate tre diverse combinazioni di concentrazioni per il sodio bicarbonato e l'acido acetico:

- 50 mMol di NaHCO_3 e 100 mMol di CH_3COOH ;
- 5 mMol di NaHCO_3 e 10 mMol di CH_3COOH ;
- 0,5 mMol di NaHCO_3 e 1 mMol di CH_3COOH .

Poiché la concentrazione del gas creato dalla reazione tende a diminuire nel tempo si è deciso, per mantenere costanti le condizioni sperimentali, di sostituire la soluzione campione dopo ogni set di misura con una “fresca”. Inoltre l'acqua della vasca in cui la flask è immersa è stata mantenuta degassata mediante il sistema di degassing del SonoWell.

I set di misura consistono in una serie di sei sonicazioni del campione mediante un fascio ultrasonoro ad una delle due frequenze in esame. In ogni sonicazione del set l'onda acustica presenterà un valore diverso del picco negativo di pressione. Le pressioni utilizzate sono quelle riportate nella tabella 7.

Per assicurare la confrontabilità dei risultati ottenuti a parità di pressione e concentrazione di gas disciolto ma a frequenza diversa si è fissato un tempo di attesa di otto minuti dopo la miscela dei componenti prima di cominciare le rilevazioni con l'idrofono. Inoltre la sequenza delle sonicazioni è stata eseguita ad intervalli regolari e per pressioni acustiche crescenti.

Per ridurre il rumore indotto dall'ambiente si è adoperato del materiale fonoassorbente. In Fig.60 sono mostrati una schematizzazione del set-up di misura e una fotografia scattata prima di un set di misura.

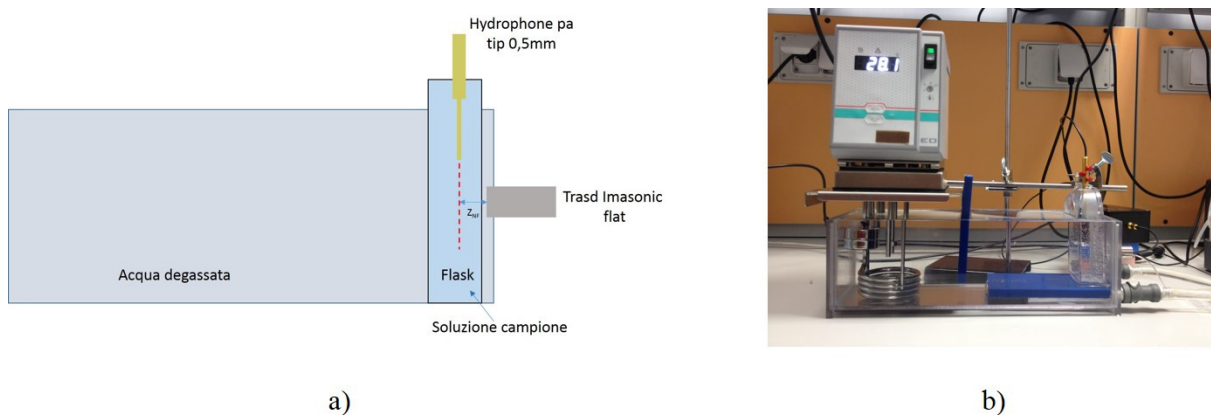


Fig. 59 a) schematizzazione del set-up di misura della cavitazione; b) foto set-up reale

Prima di ogni set di misure è stato acquisito uno spettro senza eccitare il trasduttore. Tale spettro è preso come riferimento per tenere conto del rumore ambientale e quello introdotto dall'elettronica collegata all'idrofono, preamplificatore e alimentatore. Un esempio di spettro di rumore è mostrato in Fig.61. Tale spettro sarà sottratto a quelli ottenuti per eliminare il contributo al segnale di questi rumori; il noise rilevato dopo tale sottrazione è attribuibile esclusivamente alla cavitazione.

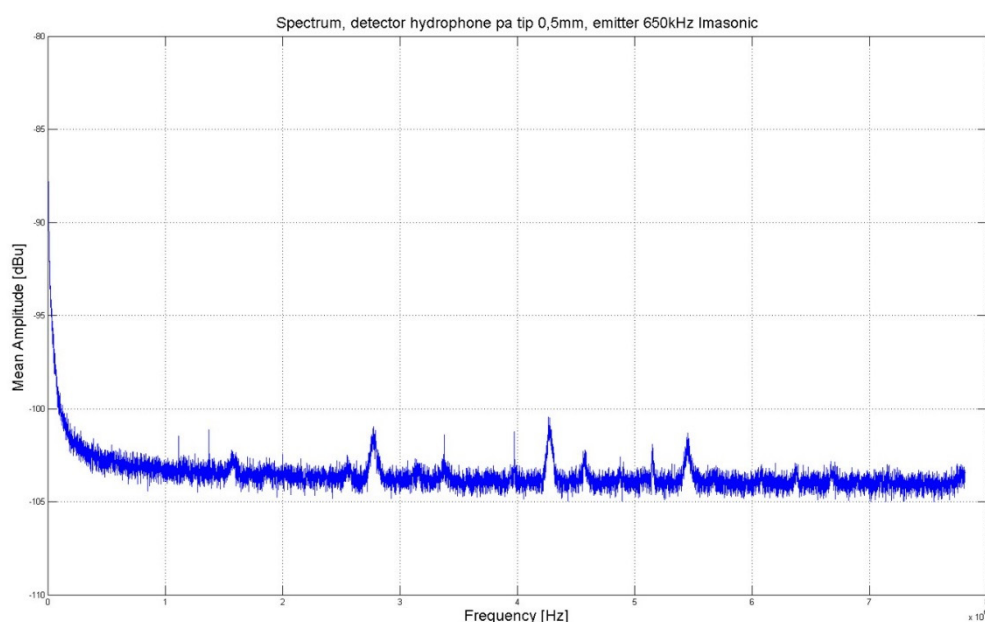


Fig. 60 Spettro del rumore ambientale ed elettronico; i picchi sono introdotti dall'elettronica connessa all'idrofono

Ultimate le rilevazioni si è passati all'analisi dei dati acquisiti; ogni spettro analizzato è la media di 32 spettri acquisiti in successione durante la sonicazione. Si è notato che non si rilevano effetti cavitativi per le concentrazioni della soluzione campione alte e basse.

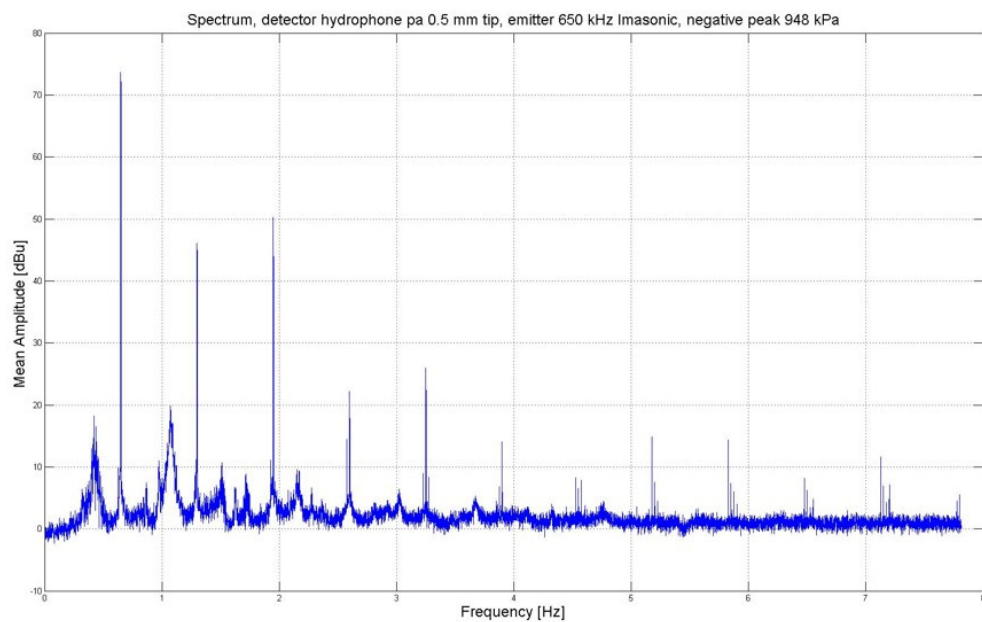
Negli spettri acquisiti durante i set di misure sonicando la soluzione con la combinazione di acido acetico e sodio carbonato media si è rilevata cavitazione inerziale quando si è utilizzato il fascio ultrasonoro a 650 kHz. L'analisi del set di misura eseguito con il trasduttore da 1 MHz, invece, mostra segni di cavitazione non inerziale.

In Fig.62 sono riportati gli spettri ottenuti sonicando con un picco di pressione negativo di 948 kPa la soluzione a concentrazione media con il trasduttore da 650 kHz, Fig.62a, e da 1 MHz, Fig.62b. In tali spettri è già sottratto il noise relativo.

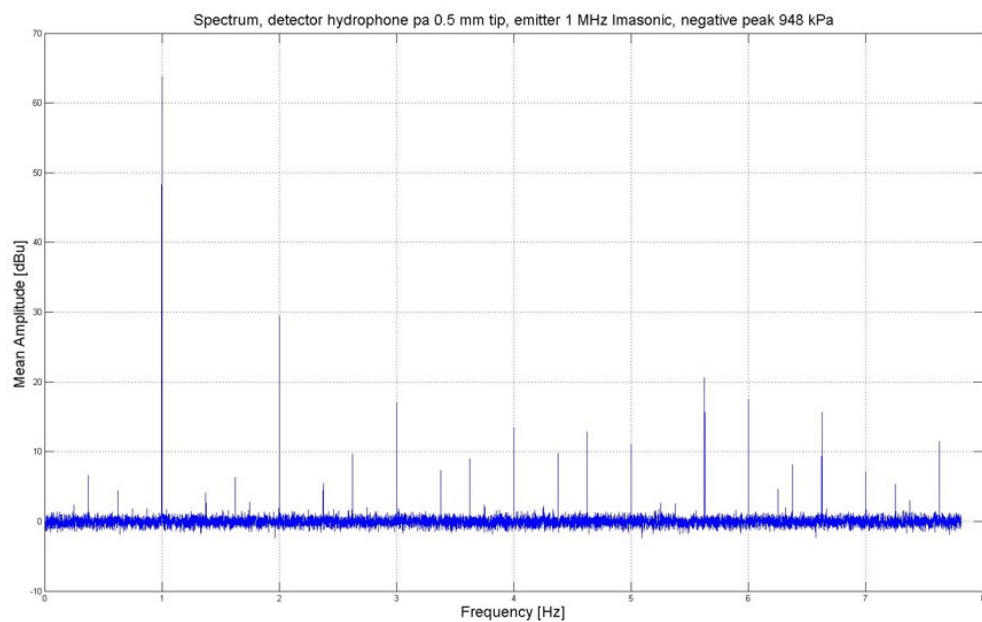
Come anticipato lo spettro della Fig.62b mette in luce la comparsa di picchi spettrali in corrispondenza di frequenze sub armoniche e ultraarmoniche. Questo fenomeno è legato alla cavitazione stabile di bolle di opportune dimensioni presenti nel campione.

Nella Fig.62a, invece, è immediatamente visibile un rumore a larga banda, che da successive analisi si è riscontrato essere presente fino a oltre 5 MHz.

Questo effetto è riscontrabile in maniera proporzionale alla pressione applicata in tutti gli spettri rilevati durante le sonicazioni a 650 kHz. In Fig.63 sono riportati cinque spettri rilevati nello stesso grafico, per semplicità di lettura non è incluso lo spettro di Fig.62a. Nella Fig.64 è mostrato uno zoom della figura precedente centrato intorno ad 1 MHz per ingrandire la zona dove il rumore di cavitazione inerziale è maggiore.



a)



b)

Fig. 61 Spettri medi ottenuti sonicando la soluzione a media concentrazione con a) 650 kHz e b) 1 MHz a parità di picco negativo di pressione

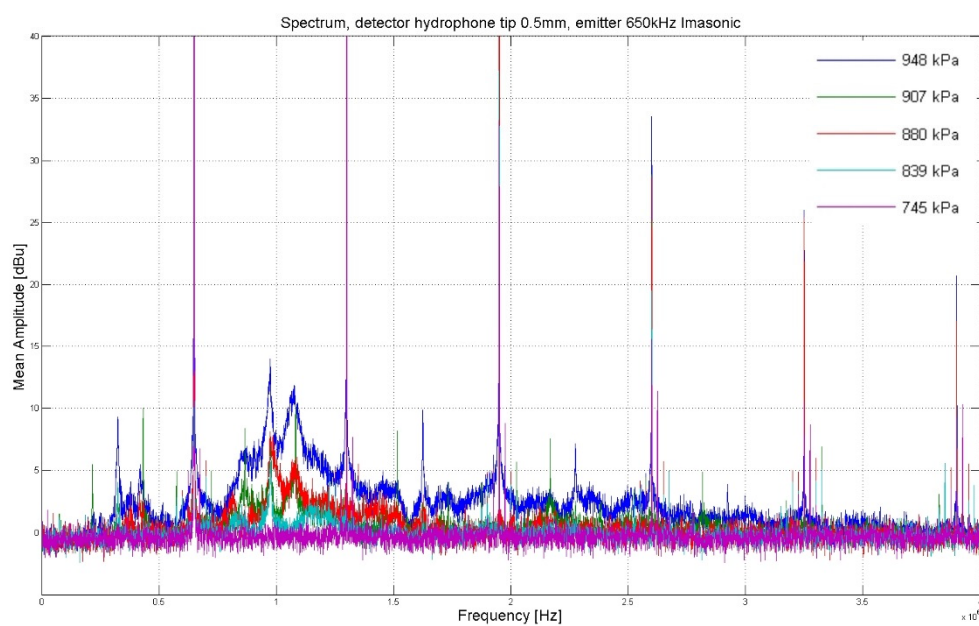


Fig. 62 Confronto fra gli spettri ottenuti con il trasduttore da 650 kHz e la concentrazione della soluzione media a vari valori di pressione

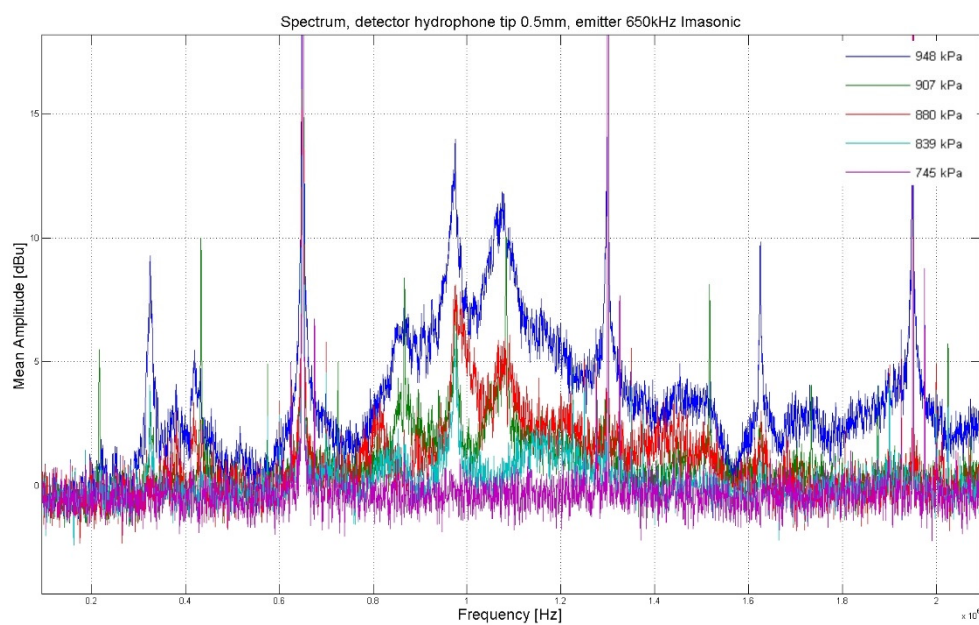


Fig. 63 Zoom centrato attorno ad 1 MHz del confronto fra gli spettri

L'analisi e la manipolazione degli spettri per ricavare un indice di cavitazione è stata effettuata utilizzando il software MestReNova della Mestrelab Research. Tale software è molto utilizzato nel campo della Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) di composti chimici.

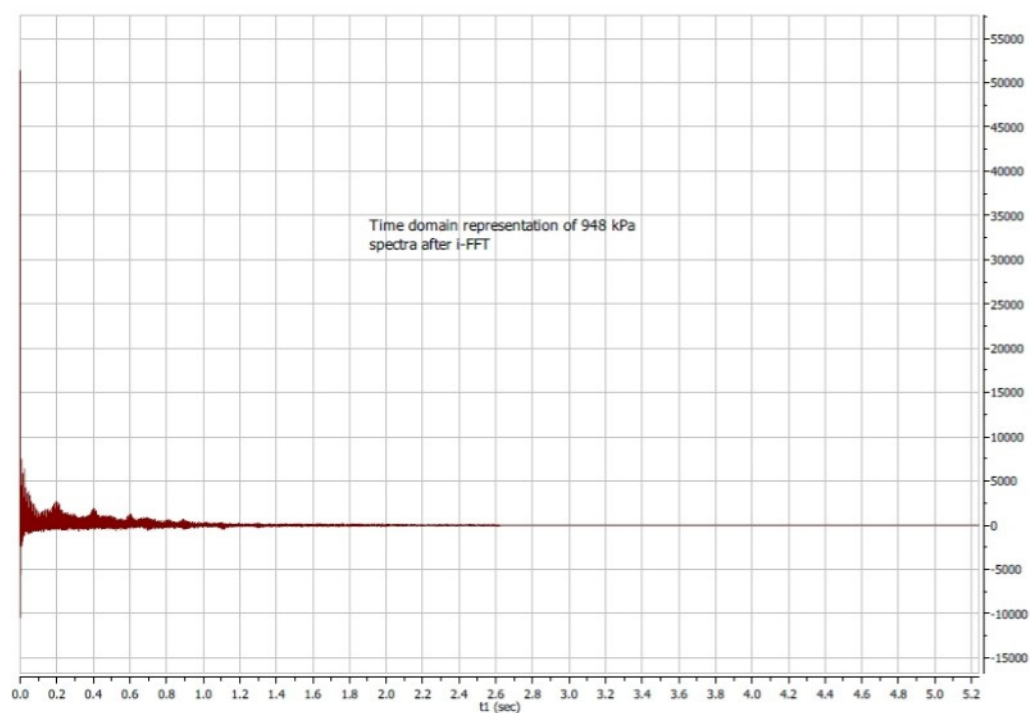
L'intento è quello di quantificare in modo accurato l'integrale dello spettro totale, e sfruttando le capacità di elaborazione matematica delle curve spettrali disponibile con il software, riuscire a valutare le componenti che contribuiscono all'integrale totale e che possiamo evidenziare bene negli spettri mostrati in Fig. 63: a) le armoniche e sub-armoniche, che solitamente presentano righe spettrali molto sottili e a frequenza ben definita come multipli o sottomultipli della frequenza di sonicazione; b) un inviluppo di segnali che assume una forma "broad-band" che si estende per centinaia di kHz fino a raggiungere anche un range di qualche MHz di larghezza. Da notare che i segnali di tipo a) sono dovuti in misura maggiore ai modi vibrazionali, sovrapposti al modo fondamentale, della lamina piezoelettrica, cioè sono causati dal trasduttore, ed in parte alla cavitazione non inerziale, cioè ad oscillazioni stabili di bolle di dimensioni tali da risuonare se sottoposte ad onde acustiche di lunghezza d'onda adeguata; quelli di tipo b) sono dovuti alla presenza di cavitazione inerziale, cioè a bolle che non vibrano in risonanza stabile, generando un segnale narrow-band come nel caso precedente, ma collassano, generano uno shock di pressione broad-band. Per tali motivi per distinguere le forme cavitative, e ricavare un indice accurato, è importante riuscire ad ottenere una robusta quantificazione di entrambi i tipi di segnale.

Inizialmente gli spettri relativi al set di misure con il trasduttore da 650 kHz e con la concentrazione media della soluzione sono stati manipolati mediante i seguenti passaggi:

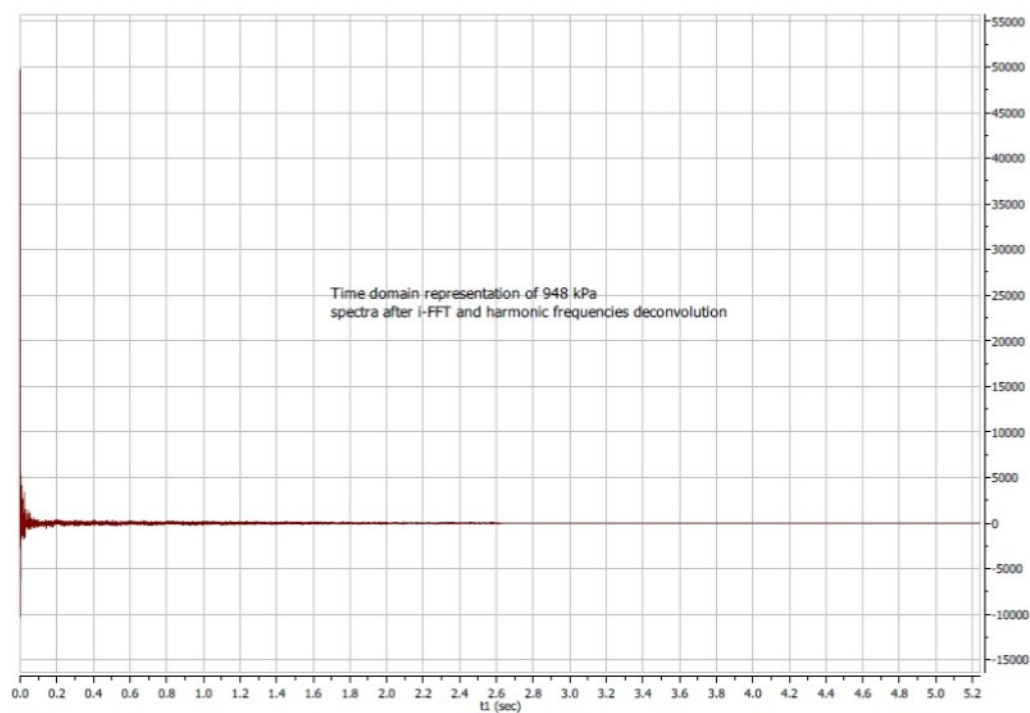
- 1) allo spettro medio viene applicata una Fast Fourier Transform (FFT) inversa e si ottiene il segnale nel dominio del tempo, Fig.65a;
- 2) con una deconvoluzione a frequenze fisse, la fondamentale e le armoniche con una banda di ± 20 Hz, si elimina il 90-95% del contributo di queste al segnale, Fig.65b;
- 3) una FFT diretta del segnale modificato nel dominio del tempo restituisce lo spettro del solo inviluppo del segnale broad-band.

In seguito integrando lo spettro dell'inviluppo, Fig.66a., e facendone il rapporto con l'integrale dello spettro del segnale originale, Fig.66b, contenente le armoniche, si ottiene un parametro il cui valore è legato all'entità del fenomeno cavitativo osservato. Per la giusta lettura degli spettri della Fig.66 è da notare che l'asse delle frequenze nel software utilizzato è ribaltato.

Durante l'analisi degli spettri si è notato che, anche in seguito alla sottrazione del noise elettronico e ambientale, la baseline non assume sempre lo stesso valore, presentando quindi un offset che contribuisce al valore assoluto dell'integrale stimato. Per rendere confrontabili i risultati ottenuti dai vari spettri, con l'algoritmo appena descritto, è necessario sottrarre dagli spettri la baseline relativa.

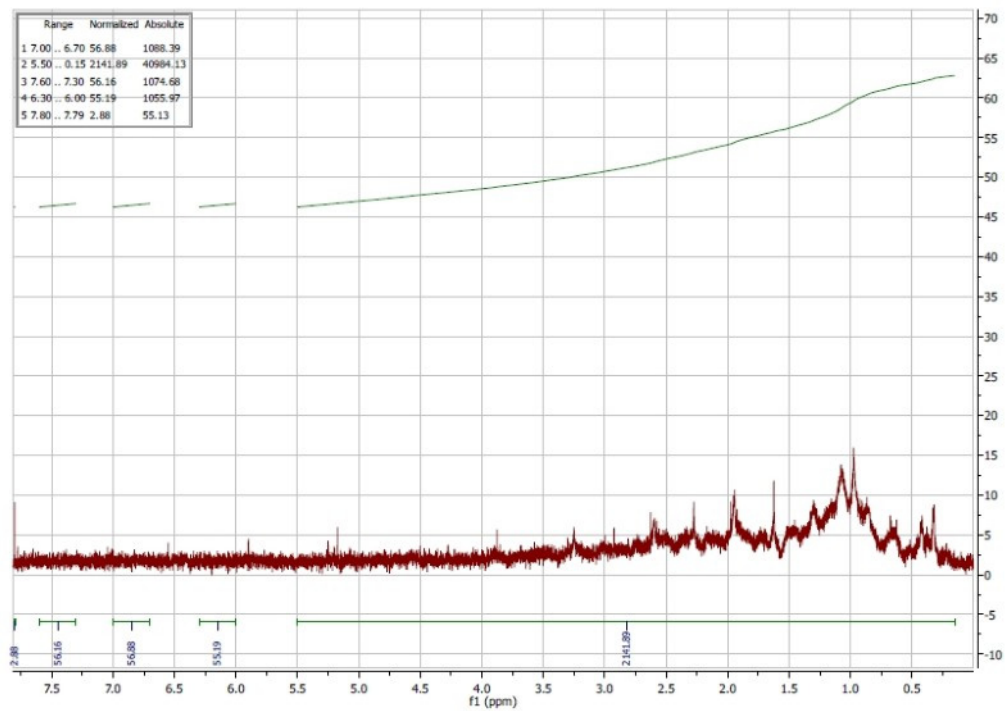


a)

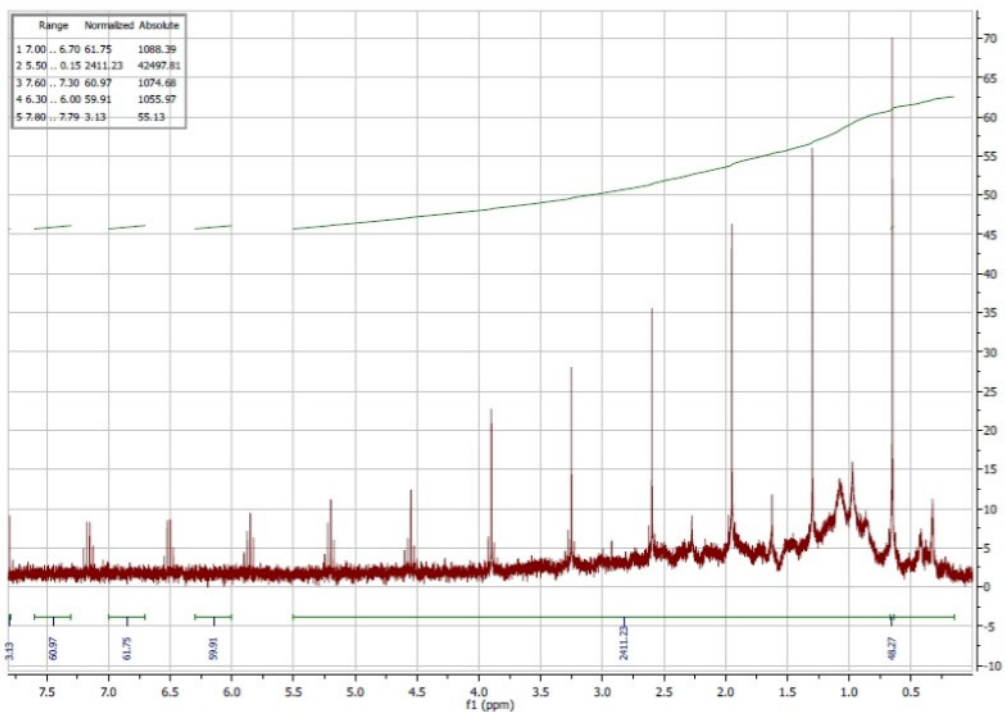


b)

Fig. 64 a) segnale nel dominio del tempo ricavato mediante FFT inversa; b) segnale privato della frequenza fondamentale e delle armoniche mediante deconvoluzione



a)



b)

Fig. 65 a) spettro dell'involuppo privato delle armoniche; b) spettro del segnale originale

Per calcolare tale valore si è deciso di sfruttare l'andamento planare di tutti gli spettri ad alta frequenza. Si sono selezionate tre finestre di frequenze, comprese tra le armoniche più alte, in cui si sono calcolati gli integrali. Mediando i risultati degli integrali si ottiene la baseline da sottrarre di volta in volta. Le finestre temporali sono ampie 200 KHz e rispettivamente comprese negli intervalli 5,75-5,95 MHz, 6,40-6,60 MHz e 7,05-7,25 MHz. In Fig. 67 è mostrato uno zoom dello spettro rilevato per 839 kPa, visualizzato con il software MestReNova, in cui sono evidenziate le finestre utilizzate per il calcolo della baseline.

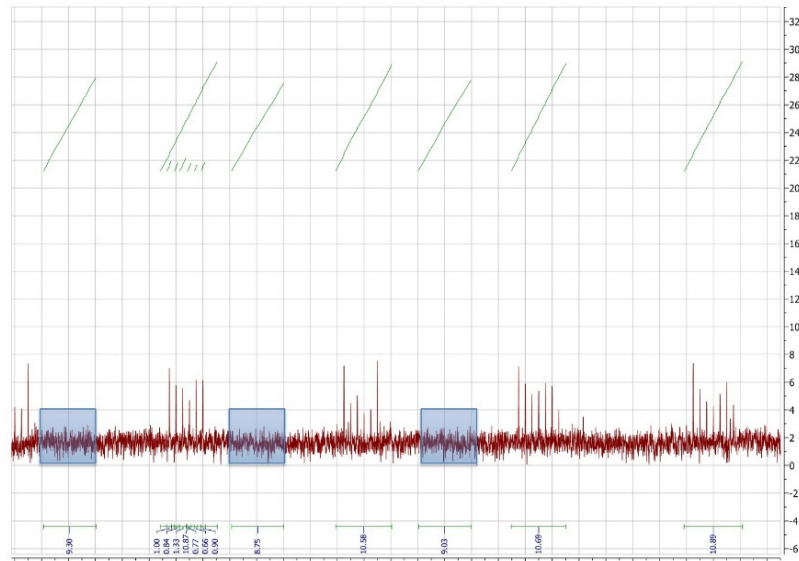


Fig. 66 Spettro rilevato a 839 kPa; le finestre di frequenza con cui è si è calcolata la baseline coincidono con i rettangoli azzurri

Mediante tale algoritmo si ottengono dei risultati precisi e confrontabili ma la manipolazione dei dati risulta essere molto complessa. Si è cercato di semplificare il calcolo dell'indice di cavitazione riducendo l'algoritmo ad una analisi spettrale.

Il nuovo algoritmo consta dei seguenti passaggi:

- 1) si calcola l'integrale dello spettro nell'intera banda;
- 2) si calcolano gli integrali in finestre di frequenza molto strette e centrate sulle armoniche per tutti i picchi;
- 3) sommando tutti i valori ricavati al punto 2 si ha un parametro legato al contributo delle sole armoniche;
- 4) sottraendo dall'integrale dello spettro totale calcolato nel punto 1 il contributo delle sole armoniche del punto 3 si ha il contributo della cavitazione;
- 5) facendo il rapporto fra il contributo dovuto dalla cavitazione e quello dovuto alle armoniche si ottiene un indice di cavitazione.

I passaggi appena elencati si intendono eseguiti su uno spettro a cui si è sottratto il noise elettronico e la baseline calcolata con il metodo della media degli integrali in tre finestre ad alta frequenza già descritta.

La bontà di tale algoritmo è confermata dalla coincidenza fra i risultati così ottenuti con quelli relativi al primo metodo illustrato (differenza < 2%).

In entrambi i casi si nota un andamento sigmoide degli indici ricavati alle varie pressioni. In Fig.68 sono riportati i risultati ottenuti mediante il secondo algoritmo.

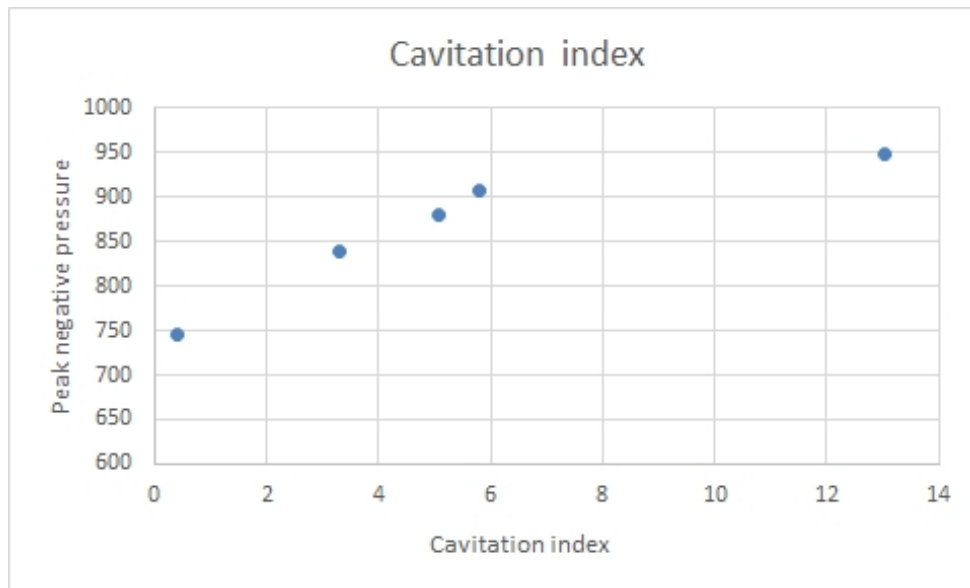


Fig. 67 Grafico degli indici di cavitazione ottenuti

Bibliografia

- [1] Brujan, E. A., Nahen, K., Schmidt, P., & Vogel, A. (2001). Dynamics of laser-induced cavitation bubbles near an elastic boundary. *Journal of Fluid Mechanics*, 433, 251-281.
- [2] Leighton, T. G. (1994). *The Acoustic Bubble* (Academic, London). Chap, 2, 67-128.
- [3] Azhari, H. (2010). *Basics of biomedical ultrasound for engineers*. John Wiley & Sons.
- [4] Apfel, R. E., & Holland, C. K. (1991). Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. *Ultrasound in medicine & biology*, 17(2), 179-185.
- [5] Frank, S., Lautz, J., Sankin, G. N., Szeri, A. J., & Zhong, P. (2015). Bubble Proliferation or Dissolution of Cavitation Nuclei in the Beam Path of a Shock-Wave Lithotripter. *Physical Review Applied*, 3(3), 034002.
- [6] Zhu, S., Cocks, F. H., Preminger, G. M., & Zhong, P. (2002). The role of stress waves and cavitation in stone comminution in shock wave lithotripsy. *Ultrasound in medicine & biology*, 28(5), 661-671.
- [7] Lai, C. Y., Wu, C. H., Chen, C. C., & Li, P. C. (2006). Quantitative relations of acoustic inertial cavitation with sonoporation and cell viability. *Ultrasound in medicine & biology*, 32(12), 1931-1941.
- [8] Fu, H., Comer, J., Cai, W., & Chipot, C. (2015). Sonoporation at Small and Large Length Scales: Effect of Cavitation Bubble Collapse on Membranes. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6(3), 413-418.
- [9] Villeneuve, L., Alberti, L., Steghens, J. P., Lancelin, J. M., & Mestas, J. L. (2009). Assay of hydroxyl radicals generated by focused ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, 16(3), 339-344.
- [10] Somaglino, L., Bouchoux, G., Mestas, J. L., & Lafon, C. (2011). Validation of an acoustic cavitation dose with hydroxyl radical production generated by inertial cavitation in pulsed mode: application to in vitro drug release from liposomes. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(2), 577-588.
- [11] Frohly, J., Labouret, S., Bruneel, C., Looten-Baquet, I., & Torguet, R. (2000). Ultrasonic cavitation monitoring by acoustic noise power measurement. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 108(5), 2012-2020.
- [12] Zeqiri, B., Gelat, P. N., Hodnett, M., & Lee, N. D. (2003). A novel sensor for monitoring acoustic cavitation. Part I: Concept, theory, and prototype development. *Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, IEEE Transactions on*, 50(10), 1342-1350.
- [13] Zeqiri, B., Lee, N. D., Hodnett, M., & Gelat, P. N. (2003). A novel sensor for monitoring acoustic cavitation. Part II: prototype performance evaluation. *Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, IEEE Transactions on*, 50(10), 1351-1362.
- [14] Sabraoui, A., Inserra, C., Gilles, B., Béra, J. C., & Mestas, J. L. (2011). Feedback loop process to control acoustic cavitation. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(2), 589-594.

- [15]Lo, C. W., Desjouy, C., Chen, S. R., Lee, J. L., Insera, C., Béra, J. C., & Chen, W. S. (2014). Stabilizing in vitro ultrasound-mediated gene transfection by regulating cavitation. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(2), 833-839.
- [16]Chettab, K., Roux, S., Mathé, D., Cros-Perrial, E., Lafond, M., Lafon, C., ... & Mestas, J. L. (2015). Spatial and Temporal Control of Cavitation Allows High In Vitro Transfection Efficiency in the Absence of Transfection Reagents or Contrast Agents. *PloS one*, 10(8), e0134247.
- [17]Chen, W. S., Brayman, A. A., Matula, T. J., & Crum, L. A. (2003). Inertial cavitation dose and hemolysis produced in vitro with or without Optison®. *Ultrasound in medicine & biology*, 29(5), 725-737.
- [18]Li, T., Chen, H., Khokhlova, T., Wang, Y. N., Kreider, W., He, X., & Hwang, J. H. (2014). Passive cavitation detection during pulsed HIFU exposures of ex vivo tissues and in vivo mouse pancreatic tumors. *Ultrasound in medicine & biology*, 40(7), 1523-1534.

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi ho mostrato come, durante il mio periodo di dottorato, abbia dovuto affrontare degli ostacoli ingegneristici legati allo sviluppo di set-up per trial preclinici in vitro ed in vivo.

Anche se i risultati biologici ottenuti con i set-up per esperimenti cellulari sono stati presentati ad un convegno internazionale e sia in atto la fase finale di scrittura di un contributo su rivista non ho riportato nessuno di tali risultati poiché l'interpretazione di essi non rientra nell'ambito delle mie competenze. Bensì ho mostrato il mio contributo all'ottenimento di set-up robusti e con un alto tasso di riproducibilità con i quali tali risultati sono stati ottenuti.

L'evoluzione del sistema per trial preclinici in vivo ha avuto una fase di arresto a causa del DLgs n. 26, del 4 marzo 2014, che ha modificato la normativa che regola l'utilizzo di animali a fini scientifici. Sono state introdotte norme più restrittive circa la stabulazione temporanea delle cavie: tali norme incidono sia a livello di ambiente che a livello del personale locale. Ciò ha causato una fase di stallo nel filone di ricerca a causa dell'impossibilità di sperimentazione su modelli animali del sistema FUS a guida MR Bruker. Benché la Promedica Bioelectronics si sia attivata per conformare i locali e le procedure alla nuova normativa e abbia inoltrato la richiesta al ministero della salute in tempi brevi l'autorizzazione alla sperimentazione animale è stata concessa solo a novembre 2015.

Ottenuta l'autorizzazione si prevede nei prossimi mesi di iniziare la sperimentazione animale e quindi di intraprendere una nuova fase di sviluppo ingegneristico del set-up.

Sul fronte della sperimentazione in vitro i test sono ormai quasi esclusivamente eseguiti con il SonoWell. Ciò è dovuto alla semplicità di utilizzo di tale strumento e dalla carenza di disponibilità di tempo macchina della MRgFUS. Infatti la risonanza magnetica del sistema MRgFUS, di proprietà dell'istituto di radiologia del policlinico di Palermo, è utilizzata sia per la diagnostica che per la ricerca; se ne deduce che i tempi di attesa fra una sessione sperimentale e l'altra siano lunghi.

Attualmente, in collaborazione con l'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna, sto lavorando alla stesura di due articoli, di cui uno in fase di lavoro molto avanzata, riguardanti la stimolazione metabolica di osteoblasti e fibroblasti irradiati da onde ultrasonore a diverse frequenze e intensità. In collaborazione con il laboratorio di fisiopatologia cellulare e molecolare del dipartimento di discipline chirurgiche ed oncologiche del Policlinico di Palermo sono tuttora in corso esperimenti di drug delivery e sonoporazione di cellule staminali tumorali.

Un punto rimasto irrisolto nel set-up del sistema benchtop è l'aumento di temperatura della fila D delle multiwell. Come detto nel capitolo IV, le ipotesi avanzate per spiegare tale effetto non sono ritenute valide. Si prevede nel futuro di riuscire ad individuarne la causa ed eliminarne l'effetto per migliorare la confrontabilità dei risultati sull'intera piastra.

Gli spunti per lo sviluppo del SonoWell sono diversi. Innanzitutto si sta cercando una soluzione per modificare il circuito di ricircolo dell'acqua a 37°C. Il trasduttore da 4,5 MHz, possedendo la distanza focale più elevata, risulta incassato in una cavità rispetto alle altre sonde. L'acqua in questa cavità ristagna e si raffredda a causa dello scambio termico con il materiale dell'holder, al cui interno scorre acqua a 10-15°C. Il gradiente termico che si crea modifica le caratteristiche acustiche dell'acqua e causa un disallineamento del piano focale del trasduttore da 4,5 MHz rispetto agli altri.

E' in fase di progettazione anche un holder di dimensioni diverse per alloggiare sonde ad ultrasuoni prodotte dall'Olympus. Tali sonde sono meno performanti rispetto ai trasduttori Imasonic ma abbattano i costi di circa il 70%. Inoltre si sta anche progettando un holder per alloggiare un solo trasduttore o quattro trasduttori alla medesima frequenza. Quest'ultima soluzione massimizzerebbe il throughput sperimentale nei casi in cui si debba usare una sola frequenza.

Per rendere il sistema user-friendly è in corso lo sviluppo di un'interfaccia software in Java per la definizione dei parametri acustici e degli spostamenti della piastra durante il trattamento. In tal modo l'utente non sarà più obbligato a conoscere il linguaggio di programmazione Python ma il codice sorgente sarà fornito in maniera automatica dal software.

Per quanto riguarda la produzione scientifica è in fase avanzata di scrittura un lavoro in cui presenterò gli algoritmi per ricavare gli indici di cavitazione, di cui si è discusso nell'ultimo capitolo, e i risultati di validazione mediante l'uso di HTA. Si prevede che sia in fase di submission per la data di esame.

In ultimo, è in fase di stesura anche un altro brevetto. Riguarderà un dispositivo per eliminare le riflessioni all'interfaccia aria-soluzione cellulare durante i test in vitro. Si prevede il deposito della versione definitiva entro aprile 2016.

PUBBLICAZIONI

Brevetto internazionale:

- Barbato G., Catallo N., **Corso C.**, Scoarughi G.L. & Dumont E.. WO2015/110955 A1, PCT patent, international publication date 30 July 2015.

Poster in congressi internazionali:

- Catallo N., Scoarughi G.L., **Corso C.**, Gorgone A., Midiri M., Livreri P., Stassi G., Dumont E., Barbato G. (2015). A versatile ultrasound system for in vitro experiments. 15th International Symposium for Therapeutic Ultrasound, April 15-18, Utrecht (Netherlands)

Articoli su rivista in preparazione:

- **Corso C.**, Scoarughi G.L., Gorgone A., Livreri P., Barbato G.. A robust and reliable algorithm to estimate an Inertial Cavitation Index using spectral analysis of the broadband noise.
- Agnese V., Costa V., Carina V., **Corso C.**, Scoarughi G.L., Barbato G., Midiri M., Stassi G., Giavaresi G., In vitro investigation of the effect of Magnetic Resonance guided Focused Ultrasound Surgery on osteosarcoma cell lines.

Ringraziamenti

Il primo ringraziamento è dedicato alla mia tutor, la prof. Patrizia Livreri, che, nonostante i suoi innumerevoli impegni, mi ha sempre appoggiato e aiutato in questi anni senza mai privarmi della mia indipendenza.

Ringrazio il prof. Alessandro Busacca che mi ha ospitato nel suo laboratorio per quasi due anni e tutti i “ragazzi” del laboratorio LOOX, i neo papà Andrea e Luciano, Riccardo, Diego, Salvatore, Gabriele, Antonino, Alessandro e tutti quelli di passaggio, non scorderò mai i pranzi del venerdì e le grigliate sul terrazzo.

Ringrazio anche tutti i professori ed i ricercatori che ho incontrato durante questo periodo di studi i quali hanno contribuito ad accrescere il mio bagaglio culturale.

Un immenso grazie va alla Promedica Bioelectronics, che ha finanziato la mia ricerca in questi anni, ed al suo amministratore delegato Leonardo Gorini; a Gaetano che con periodiche, ed a volte estenuanti, teleconferenze riesce a stimolare e ad indirizzare il gruppo R&D; a Gian Luca che prima o poi si impossesserà totalmente del mio laboratorio; a Tania ed il suo “malo carattere”; ad Ilaria e la sua ansia; a Nadia ovunque sia; ad Alessandro ed i suoi droni e ad Andrea che mi ha svelato i trucchi della FUS fra una risata e l'altra.

Immancabilmente un ringraziamento è dedicato ad i miei genitori che mi hanno sempre sostenuto, ed in particolar modo in questo ultimo anno, a mia sorella, mio cognato ed i miei nipotini Michele/Capitan America/Spiderman/Mitico Thor e chi più ne ha più ne metta e Svevuzza.

Dulcis in fundo un ringraziamento particolare va a Chiara che mi supporta e sopporta da molto tempo, senza di lei ed il suo aiuto non sarei arrivato a questo traguardo. Grazie per quello che hai sempre fatto per me non so se riuscirò mai a ripagarti. Ma soprattutto grazie per avermi regalato la cosa più bella della mia vita, Sara, che da nove mesi con i suoi sorrisi e i suoi gorgheggi ha reso più felici i nostri giorni e movimentate le nostre notti.

Appendice A: scheda tecnica SonoWell



SonoWe
ULTRASOUND
IN LIFE SCIENCE

PROMEDICA
BIOELECTRONICS

Specifications		
Transducers (default configuration)	n. Transducers	4
	Type	Flat
	Active element diameter [mm]	12
	Frequencies [MHz]	0.65, 1.0, 2.4, 4.5
	Max Acoustic Power (CW, 60 s) [W/cm ²]	6
	Connector	SMA
	Transducer Temperature sensor	Yes
Signal generator	Amplifier	Linear Class A/B
	Supply	240V 50Hz
	n.parallel channels	4 to 8
	Max Power/Channel [W]	20
	Power output measurement	Yes
	Power reflected measurement	Yes
	Bandwidth [MHz]	0.5-5.0
	Wave pattern	Sine
	Modulation	Tone Burst
	Dutycycle	up to 100%
	Pulse repetition frequency [Hz]	up to 90
Hydraulic system	Pump water tank	1.0 Liter/min
	Degassing water tank	On-Line Cartridge
	Thermostat Tank Power	2000W
	Tank temperatur range	RT - 65°C
	Transducer cooling pump	100 ml/min
	Transducer Chiller Cooling Power	80W
	Water Tank Capacity	10 Liters
Mechanical System	Stepper Motors	3
	Independent Axis Movement	X, Y, Z
	Minimum step	250µm
Custom Options	Transducers frequency range [MHz]	0.5-5.0
	Transducers type	Flat, Focused ⁽¹⁾
	Number of transducer ⁽²⁾	up to 8
	Transducer acoustic power	customizable ⁽³⁾
	Transducer connector	SMA, BNC, UHF ...
	Water tank capacity	customizable
	Dimensions	to fit in a standard 120cm sterile hood
	Number of independent axis in mechanical system	1-3

⁽¹⁾ radius of curvature and focal distance are dependent on desired frequency and active element diameter

⁽²⁾ the transducers can be all at the same frequency to maximize the throughput

⁽³⁾ dependent on the constructive limits and on the generator electrical max output power