

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Workshop

La reologia del sangue: una scienza multidisciplinare

**Istituto Superiore di Sanità
Roma, 8 novembre 2002**

Atti a cura di

Patrizia Caprari (a) e Maria Cristina Martorana (b)

(a) Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Croce Rossa Italiana, Centro Nazionale Trasfusione Sangue, Roma

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

03/13

Istituto Superiore di Sanità

Workshop. La reologia del sangue: una scienza multidisciplinare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 8 novembre 2002.

Atti a cura di Patrizia Caprari e Maria Cristina Martorana

2003, 99 p. Rapporti ISTISAN 03/13

La reologia del sangue o emoreologia ha avuto, in questi ultimi anni, un crescente sviluppo in diverse aree biomediche. Il Workshop organizzato dall'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con la Società Italiana di Medicina Trasfusionale e Immunoematologia e con il patrocinio della Società Italiana di Reologia, rappresenta un importante momento di confronto e di scambio di idee ed esperienze tra diverse realtà professionali che lavorano in questo campo. L'emoreologia fornisce strumenti utili di diagnosi e monitoraggio clinico di varie patologie quali le sindromi da iperviscosità, le policitemie, l'anemia falciforme, le sindromi uremiche, le neoplasie maligne e studia la fluidodinamica degli organi artificiali. Varie tecniche reologiche vengono impiegate in medicina trasfusionale per chiarire i meccanismi dell'invecchiamento eritrocitario delle emazie conservate per trasfusione e per valutare la modulazione farmacologica della deformabilità eritrocitaria.

Parole chiave: Emoreologia, Sangue, Sindromi da iperviscosità, Medicina trasfusionale

Istituto Superiore di Sanità

Workshop. The rheology of blood: a multi-disciplinary science. Istituto Superiore di Sanità. Rome, November 8, 2002.

Proceedings edited by Patrizia Caprari and Maria Cristina Martorana

2003, 99 p. Rapporti ISTISAN 03/13 (in Italian)

In the last years, the rheology of blood or haemorheology has had an increasing development in various areas of biology and medicine. This Workshop, organized by the Istituto Superiore di Sanità (the Italian National Institute of Health) and the Società Italiana di Medicina Trasfusionale e Immunoematologia, under the auspices of the Società Italiana di Reologia, represents an important moment in which different ideas and experiences of various professional realities could be faced and exchanged among all people operating on this field. Haemorheology gives useful tools for the diagnosis and clinical monitoring of several disorders, including hyperviscosity syndromes, polycythemia, sickle cell disease, uremic syndromes, and malignant neoplasias and it investigates the fluid dynamic aspects of artificial organs. In transfusion medicine, several rheological techniques are actually employed to understand the erythrocytes aging of stored red blood cells and to evaluate erythrocyte deformability by drug modulation.

Key words: Haemorheology, Blood, Hyperviscosity syndromes, Transfusion medicine

Per informazioni su questo documento scrivere a: caprari@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it/pubblicazioni.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2003 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Introduzione

Maria Cristina Martorana, Patrizia Caprari 1

Emoreologia clinica e sindromi da iperviscosità

Gregorio Caimi 2

La formazione del trombo piastrinico in condizioni di flusso

Mario Mazzucato 9

Alterazioni emoreologiche nell'anemia falciforme

Paolo Cianciulli 14

Alterazioni emoreologiche nei pazienti uremici

*Marco Ballestri, Federica Ferrari, Paolo Manfredini,
Giulia Ligabue, R. Magistroni, Alberto Albertazzi* 18

Danni ossidativi e funzionali durante l'invecchiamento eritrocitario

Patrizia Caprari, Anna Tarzia, Maria Cristina Martorana, Dario De Felicis 26

Deformabilità e conservazione dei globuli rossi

Roberto Reverberi, Maurizio Govoni 34

Ipotesi di costruzione di valori di riferimento in emoreologia indipendenti dall'ematocrito partendo da un modello matematico

Maria Cristina Martorana, Giorgio Mojoli, Emilio Mannella 40

Modulazione farmacologica della deformabilità eritrocitaria

Maurizio Govoni, Vanda Randi 44

Il ruolo della fluidodinamica negli organi artificiali: tecniche di misura

*Mauro Grigioni, Carla Daniele, Giuseppe D'Avenio, Umberto Morbiducci,
Costantino Del Gaudio, Antonio Balducci, Mara Abbate, Vincenzo Barbaro* 51

Bioreologia: modelli di comportamento e metodi sperimentali

Bruno de Cindio 67

La tecnica reologica del creep applicata a componenti ematiche come aiuto diagnostico nelle neoplasie maligne

*Paolo D'Antona, Giuseppe Nunziata, Giovanni D'Arena,
Domenico Gabriele, Bruno de Cindio* 91

INTRODUZIONE

Maria Cristina Martorana (a), Patrizia Caprari (b)

(a) *Croce Rossa Italiana, Centro Nazionale Trasfusione Sangue, Roma*

(b) *Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Il Workshop “La reologia del sangue: una scienza multidisciplinare” è una giornata di approfondimento e di confronto rivolta a tutti coloro che si occupano di argomenti e problemi riguardanti la reologia del sangue e dei fluidi biologici. È un evento formativo, accreditato presso il Ministero della Salute (n. 8-22131), organizzato dall’Istituto Superiore di Sanità (ISS) in collaborazione con la Società Italiana di Medicina Trasfusionale e Immunoematologia con il patrocinio della Società Italiana di Reologia.

Durante la programmazione e la realizzazione di questa giornata, abbiamo cercato di avere curiosità, attenzione, equilibrio di giudizio e confronto aperto alle opinioni, qualità queste essenziali per il tipo di iniziativa che volevamo delineare, che fosse aperta a tutte quelle professionalità, anche distanti fra loro, che si occupavano di reologia del sangue.

Questa iniziativa, rivolta a clinici, ricercatori, trasfusionisti, farmacologi, ingegneri, biochimici, ha lo scopo di far dialogare realtà culturali e lavorative diverse per un reciproco arricchimento scientifico e professionale.

Non è stato casuale l’aver voluto mettere a confronto queste professionalità, poiché puntavamo ad una rilettura dei temi chiave della biologia e della medicina trasfusionale alla luce della reologia applicata a vari settori come:

- i) l’invecchiamento delle emazie conservate e i conseguenti danni ossidativi e funzionali;
- ii) il susseguirsi, in condizione di flusso, di eventi poco noti nella formazione di un trombo;
- iii) la dinamica e la modulazione nelle applicazioni farmacologiche;
- iv) le alterazioni emoreologiche in globuli rossi patologici come quelli falcemici o talassemici;
- v) l’approccio emoreologico alla fluidodinamica negli organi artificiali;
- vi) l’emoreologia come strumento diagnostico.

Centro e asse di rotazione della giornata sono stati, oltre agli interventi, il dibattito e lo scambio di idee che hanno portato tutti i partecipanti a cercare di cogliere la pluralità dei saperi e delle esperienze, per individuare itinerari nuovi che potrebbero avere significati diversi, addirittura opposti, o solo alternativi.

Abbiamo voluto costruire lo “spazio” di una giornata di Workshop che potesse cercare nuove connessioni di lavoro e di riflessione: l’effetto si riuscirà a vedere nel tempo.

Ci auguriamo che il bilancio dell’iniziativa corrisponda agli intenti, e che evidenzii quello a cui noi abbiamo puntato: organizzare con rigore un convegno, gruppi di lavoro e circolazione di idee, di una scienza, solo in parte lontana, come la reologia, e le strette connessioni che essa ha con la biologia e la medicina, per cercare di comporre e valutare un quadro d’insieme, rifiutando le chiusure autoreferenziali.

EMOREOLOGIA CLINICA E SINDROMI DA IPERVISCOITÀ

Gregorio Caimi

Cattedra di Semeiotica e Metodologia Medica, Università degli Studi di Palermo

Introduzione alla viscosità del sangue

Il fluire del sangue all'interno dei vasi è influenzato, oltre che dalla velocità ematica e dalla geometria del vaso, dalla viscosità ematica, definibile come la resistenza che il sangue oppone al suo scorrimento.

In generale il coefficiente di viscosità di un fluido esprime il rapporto tra forza applicata per unità di area e relativo gradiente di velocità. Questo gradiente di velocità è chiamato *shear rate* ed è espresso in s^{-1} . La forza per unità di area che produce lo *shear rate* è chiamata *shear stress* e viene espressa in $dyne/cm^2$. La viscosità corrisponde al rapporto esistente tra *shear stress* e *shear rate*. I fluidi in cui tale rapporto è costante sono indicati come newtoniani; nei fluidi non newtoniani come il sangue la viscosità varia soprattutto al variare della velocità di scorrimento e delle caratteristiche anatomico-funzionali dell'albero circolatorio.

Per i fluidi newtoniani è valida la legge di Poiseuille-Hagen con la quale si può valutare il volume di un fluido che scorre attraverso un tubo nell'unità di tempo. Il sangue è un fluido inhomogeneo che scorre in vasi con differente elasticità, spinto ad intermittenza da una pressione variabile. Se il sangue fosse un liquido newtoniano una variazione in aumento del flusso potrebbe aversi aumentando la pressione o il raggio del vaso, ma non essendo tale, la viscosità consente variazioni di flusso con minime oscillazioni della pressione.

Oltre allo *shear stress* e allo *shear rate*, il sangue è caratterizzato da uno *yield stress*, cioè da una forza minima richiesta per mettere in moto la colonna liquida. I fluidi newtoniani non posseggono *yield stress*; appena si applica loro una forza, per quanto piccola essa sia, iniziano a muoversi. L'importanza dello *yield stress* è data dal fatto che, nei distretti circolatori ove il flusso a volte si arresta, si deve vincere lo *yield stress* affinché il sangue possa di nuovo fluire.

Le determinanti emoreologiche sono: massa cellulare, viscosità del plasma, deformabilità e aggregabilità eritrocitaria. Ognuna di esse interviene in definiti settori della circolazione, in relazione al gradiente di velocità che vige in quel settore.

I fattori responsabili della deformabilità eritrocitaria sono: rapporto superficie/volume, fluidità del contenuto intracellulare, visco-elasticità di membrana.

L'aggregabilità dipende dall'interazione tra proteine plasmatiche ed emazie ed è funzione di: proteine plasmatiche (concentrazione, dimensione, densità), cariche di superficie eritrocitaria, coefficiente dielettrico plasmatico, proprietà meccaniche della membrana.

Le sindromi da iperviscosità

Si dividono in primarie e secondarie. L'attuale trattazione sarà limitata alle forme primarie, cioè alle condizioni in cui l'alterazione permanente di uno dei fattori determinanti la viscosità ematica ha come conseguenza un disturbo microcircolatorio localizzato in alcuni organi e apparati. Al contrario, nelle sindromi da iperviscosità secondarie (o sindromi "con"

iperviscosità) alterazioni del flusso sanguigno condizionano variazioni della viscosità ematica, come avviene nell'ipertensione arteriosa, nella cardiopatia ischemica acuta e cronica, nell'arteriopatia obliterante degli arti inferiori, nella cerebrovasculopatia acuta e cronica, nelle dislipidemie, nelle angioneurosi e in parte nella malattia diabetica.

I tre fattori strutturali in grado di modificare in modo stabile e permanente la viscosità ematica sono la massa cellulare, le proteine plasmatiche e la deformabilità eritrocitaria. In base alla prevalenza di uno di questi tre fattori si distinguono tre sindromi da iperviscosità primaria: policitemica, sierica e sclerocitemica.

Sindrome da iperviscosità policitemica

Comprende i seguenti quadri clinici, tutti caratterizzati da un aumento della massa cellulare circolante: la policitemia vera, l'eritrocitosi, le leucosi iperleucocitiche e le trombocitemie.

Policitemia vera

È un disordine primitivo dell'emopoiesi cui consegue aumento del numero dei globuli rossi e dell'ematocrito. Ne derivano alterazione del volume ematico e iperviscosità ematica, nonché una serie di modificazioni emodinamiche e metaboliche, generali e distrettuali, che nella loro progressione caratterizzano la storia naturale della malattia.

È elevata l'incidenza di fenomeni tromboembolici arteriosi e venosi, che possono manifestarsi all'esordio clinico (nel 30-50% dei pazienti) o complicare il decorso, e sono fatali nel 40% circa dei casi. La sopravvivenza media dei pazienti non trattati è di circa 18 mesi.

Le manifestazioni cerebrovascolari quali cefalea, amaurosi, vertigini, acufeni e diminuzione del *visus* sono spesso presenti all'esordio; anche le alterazioni del circolo periferico sono frequenti e possono determinare dolore urente alle dita dei piedi o manifestazioni come la porpora discromica e le lesioni pregangrenose.

Le complicanze venose interessano sia i vasi profondi (15% dei casi) che quelli superficiali (21% dei casi) degli arti inferiori. Alla trombosi venosa predispone l'aumento della viscosità ematica, che riduce il flusso in un distretto fisiologicamente caratterizzato da bassi *shear rate*.

A livello arterioso l'aumentato rischio trombotico è correlato alle modificazioni della velocità di flusso e ai rapporti che il sangue contrae con la parete vascolare.

Poiché viscosità e flusso sono correlati in modo inverso, l'aumento della viscosità provoca una riduzione del flusso ematico che, a sua volta, condiziona un ulteriore incremento della viscosità.

Eritrocitosi

Può essere distinta in assoluta e relativa, a seconda che si abbia un vero aumento della massa cellulare o una riduzione del volume plasmatico per significativa perdita di liquidi (*inspissatio sanguinis*).

Nell'ambito dell'eritrocitosi assoluta vanno distinte le condizioni con appropriata produzione di eritropoietina e quelle con produzione anomala e/o inadeguata.

Nel primo sottogruppo il ridotto apporto tissutale di O₂ induce la secrezione di eritropoietina e ciò avviene in corso di insufficienza respiratoria cronica, nella permanenza ad alte quote, in corso di cardiopatie congenite cianogene, in presenza di emoglobine anomale o per alterazioni del 2,3 difosfoglicerato.

Nel secondo sottogruppo l'eritrocitosi compare in seguito a secrezione autonoma di eritropoietina da parte di neoplasie, oppure per ischemia renale localizzata, con stimolazione della secrezione di eritropoietina.

La sindrome da iperviscosità delle eritrocitosi si accompagna a manifestazioni vascolari meno frequentemente di quanto avviene nella policitemia vera.

Un cenno a parte merita la Sindrome di Gaisbock (o eritrocitosi spuria), nella quale l'aumento dell'ematocrito e della viscosità sono dipendenti da una diminuzione del volume plasmatico, con massa eritrocitaria normale. Questi pazienti, spesso obesi, forti fumatori e ipertesi, presentano un'alta incidenza di fenomeni tromboembolici (circa il 30%), e alti livelli di carbossiemoglobina.

Leucosi iperleucocitiche

Il termine indica patologie caratterizzate da una conta leucocitaria superiore a 100.000/mmc. Malgrado l'elevata massa cellulare, esse si associano raramente alla sindrome da iperviscosità ematica policitemica. La viscosità e l'eritrocrito sono legati da una funzione di tipo logaritmico, mentre la relazione tra viscosità e leucocrito è di tipo esponenziale.

Il leucocrito dipende non solo dal numero, ma anche dal volume leucocitario. Il volume leucocitario medio raggiunge i valori più elevati nella leucosi mieloide cronica (450 fl), è minore nella mieloide acuta (400 fl), nella linfatica acuta (300 fl) e nella linfatica cronica (200 fl). Per questo, affinché si raggiunga lo stesso leucocrito e, a parità di eritrocrito, la stessa viscosità, occorre che il numero dei leucociti nella linfatica cronica sia almeno doppio rispetto a quello osservato nella mieloide cronica. Questo spiega perché l'iperviscosità sia un fenomeno raro, pressoché esclusivo di alcuni pazienti con mieloide cronica. In genere l'iperviscosità compare per un leucocrito > 15 ml/dl.

La sintomatologia clinica di questa forma di iperviscosità policitemica è eterogenea: frequenti le manifestazioni cardio-respiratorie, vascolari e neurologiche. La leucostasi rappresenta un fattore prognostico negativo che, se non precocemente e tempestivamente corretto, è causa di *exitus* in circa la metà dei pazienti con leucemia iperleucocitica.

Trombocitemie

I pazienti con una conta piastrinica molto elevata, oltre ad avere un alto rischio trombotico ed emorragico, possono presentare sintomi quali cefalea, nausea, deficit della sensibilità e paresi transitorie, da correlare a ridotta perfusione del microcircolo cerebrale.

Sindrome da iperviscosità sierica

Si caratterizza per la presenza di una frazione proteica anomala, mono o policlonale, capace di alterare in modo irreversibile la reologia ematica. Se la presenza di proteine a basso peso molecolare consente al plasma di rimanere un liquido newtoniano, l'aumento del peso molecolare delle proteine fa acquisire al plasma le proprietà di un liquido non newtoniano.

Per le immunoglobuline monoclonali i fattori determinanti la condizione di iperviscosità sono la viscosità intrinseca, la concentrazione e la capacità di formare complessi non immuni. Per le immunoglobuline policlonali determinante è la capacità di formare immunocomplessi, più o meno solubili, nei quali uno dei costituenti possa fungere da fattore reumatoide.

Il manifestarsi di iperviscosità dipende dal tipo di proteina in eccesso, dalla sua concentrazione (il rischio è molto elevato con livelli maggiori di 8 g%), dai livelli di fattore

reumatoide e di immunocomplessi circolanti. Le immunoglobuline che danno più frequentemente iperviscosità sono le IgM, ma anche le IgA e le IgG (soprattutto le IgG₃). Raramente l'iperviscosità si associa a mielomi a IgD, IgE e catene leggere.

I sintomi sono principalmente oculari, ematologici, neurologici e cardiovascolari, raramente polmonari o renali.

La sindrome da iperviscosità ematica sierica può accompagnare i seguenti quadri clinici: Macroblobulimemia di Waldenström, Mieloma multiplo, Malattie del connettivo e Crioglobulinemie.

Macroglobulinemia di Waldenström

Le IgM sono le Ig dotate di maggior potere "reologico". Questo spiega perché un incremento monoclonale delle IgM provochi quasi sempre un aumento della viscosità ematica e plasmatica, e nel 50% circa dei casi una sindrome da iperviscosità. L'entità delle manifestazioni cliniche è correlata alle dimensioni delle IgM, alla forma pentamerica e asimmetrica che conferisce loro un'elevata viscosità intrinseca, e in qualche caso alla capacità di formare aggregati molecolari.

Se la concentrazione delle IgM si mantiene entro 2 g% la viscosità plasmatica può essere normale o lievemente aumentata. Quando il livello delle IgM supera tale valore, avremo un aumento lineare o esponenziale della viscosità, a seconda del meccanismo prevalente tra quelli sopra descritti.

Mieloma Multiplo (MM)

La maggior parte dei mielomi che presentano sindrome da iperviscosità sono ad IgA. Nel 14-25% dei pazienti affetti da mielomi ad IgA è presente la sindrome clinica, rispetto al 4-8% di quelli con forme ad IgG. Nell'ambito di questi ultimi, quelli ad IgG₃ (percentualmente solo l'8% dei mielomi ad IgG), presentano elevata incidenza di iperviscosità, riflettendo la tendenza delle IgG₃ a formare aggregati molecolari già a concentrazioni di circa 4 g%, mentre in presenza di IgG₁ la concentrazione deve raggiungere almeno i 15 g%. Immunoglobuline della sottoclasse IgG_{2b}, dotate di viscosità intrinseca elevata, provocano iperviscosità anche a concentrazioni non molto elevate. È stato descritto un solo caso di mieloma ad IgE con sindrome da iperviscosità, attribuibile alle proprietà di crioglobulina della paraproteina, presente a concentrazioni di 30 g%. Nei mielomi a catene leggere la formazione di tetrameri kappa è ritenuta responsabile di alterazioni della viscosità, e dipende principalmente dalla distribuzione dei residui idrofobici o aromatici nella sequenza aminoacidica.

Malattie del connettivo

Una sindrome da iperviscosità sierica può accompagnare l'aumento policlonale delle immunoglobuline in malattie quali artrite reumatoide, sindrome di Felty, sindrome di Sjögren, LES e sclerodermia. L'aumento della viscosità sierica è principalmente correlato con la concentrazione delle gammaglobuline e con il titolo del fattore reumatoide.

In soggetti con malattie del connettivo e iperviscosità sono stati evidenziati "complessi intermedi" formati da IgG con attività di fattore reumatoide, che aggregano con altre IgG. Usualmente entrambe le componenti (soprattutto IgG₃) sono di natura policlonale, anche se sono state descritte immunoglobuline monoclonali della classe IgA con attività di fattore reumatoide.

Altri meccanismi implicati nella genesi dell'iperviscosità sono le interazioni molecolari tra due o più frazioni proteiche. È stato ipotizzato che l'interazione di IgM aventi attività di fattore

reumatoide con complessi immuni IgG-IgG dia origine a conglomerati molecolari di elevato peso molecolare responsabili dell'iperviscosità sierica.

Crioglobulinemia

Esistono due tipi di crioglobuline: quello di tipo monoclonale e quello di tipo misto. Nel primo tipo, tra le crio-IgG, le IgG₃ hanno una tendenza concentrazione-dipendente a formare aggregati. Le crioglobuline di tipo misto sono a loro volta suddivise in due forme: nella prima una delle due componenti, di solito la IgM, è monoclonale, nell'altra entrambe le componenti sono policlonali.

Il fenomeno della crioprecipitazione, oltre a provocare iperviscosità con secondari fenomeni occlusivi a livello del microcircolo, può causare una risposta infiammatoria mediante attivazione del complemento o interazione diretta con le cellule dell'infiammazione. Nelle venule post-capillari dei vasi cutanei, dove bassi *shear rate* sono associati ad una bassa temperatura, è facilitata la formazione di crioprecipitati con conseguenti lesioni ischemiche.

Il fenomeno opposto alla formazione di aggregati a basse temperature è la piroglobulinemia, ovvero la tendenza delle Ig a formare aggregati ad alte temperature. Il verificarsi di entrambi gli eventi è stato osservato in mielomi IgG, IgM, e in malattie delle catene pesanti sia kappa che lambda.

Sindrome da iperviscosità sclerocitemica

Si caratterizza per una ridotta deformabilità eritrocitaria, dovuta a trasformazioni irreversibili, in genere di origine genetica, di una o più strutture dell'eritrocita. L'elemento comune è quindi la sclerocitosi.

Questa sindrome si manifesta in diverse condizioni cliniche che hanno in comune l'emolisi, riconducibile ad alterazioni strutturali dell'eritrocita. La sintomatologia clinica risulterà correlata all'espressività della malattia e al tipo di anomalia strutturale. Le condizioni morbose interessate sono l'anemia a cellule falciformi, la sferocitosi, l'ellissocitosi e altre emoglobinopatie.

Anemia falciforme

L'espressione più caratteristica e drammatica della falcemia è rappresentata dalle crisi dolorose vaso-occlusive, scatenate dalla falcizzazione degli eritrociti in ambiente a bassa pressione di ossigeno. La ridotta deformabilità delle cellule falcemiche provoca rallentamento del flusso, aggravamento dell'ischemia e ulteriore falcizzazione.

Fattori che favoriscono l'insorgenza delle crisi sono le infezioni, il freddo, la gravidanza, l'anestesia, ma i meccanismi in causa non sono conosciuti. Non è stato dimostrato un nesso causale tra deossigenazione sistemica e occlusioni vascolari.

Nell'anemia falciforme sono presenti due tipi di eritrociti, quelli la cui falcizzazione è reversibile con il normalizzarsi della pressione di ossigeno (*Reversibly Sickle Cells*, RSC) e quelle irreversibilmente falcizzate (*Irreversibly Sickle Cells*, ISC).

Le ISC (presenti in misura dall'1 al 30%) presentano, anche a pressione di ossigeno normale, anomalie citoplasmatiche quali emoglobina polimerizzata, perdita di potassio e liquidi intracellulari, aumento della concentrazione di calcio e adesione di emoglobina S e di emoglobina denaturata allo strato interno della membrana plasmatica. Le RSC sono meno

compromesse, dal punto di vista reologico e metabolico, rispetto alle ISC, e mostrano un contenuto totale di cationi e di acqua intracellulare quasi nella norma.

Prima dell'inizio di una crisi il numero delle ISC può aumentare, con consensuale riduzione della filtrabilità ematica, successivamente il numero si riduce leggermente per presumibile intrappolamento nelle aree ischemiche. Altri autori hanno dimostrato che le crisi occlusive sono associate ad aumentata adesività *in vitro* delle RSC alle cellule endoteliali. L'adesione delle RSC precederebbe l'intrappolamento delle ISC che esita in un'ostruzione del microcircolo.

Nei periodi intercritici è stata osservata un'ampia fluttuazione della deformabilità eritrocitaria. Per ragioni non chiarite manca una relazione diretta fra concentrazione delle ISC e probabilità di insorgenza di una crisi falcemica.

Sferocitosi

Gli eritrociti di soggetti affetti da sferocitosi, nel corso della loro maturazione, perdono frammenti della membrana plasmatica sotto forma di microvescicole contenenti proteine integrali, trasformandosi in sferociti.

La diminuzione della superficie cellulare è verosimilmente secondaria a diversi meccanismi, tutti responsabili di un'alterata connessione tra le proteine di membrana e quelle del citoscheletro. Nell'uomo sono state evidenziate varie anomalie tra le quali una difettosa sintesi di spectrina, un'anormalità della proteina 4:1 e un'alterata interazione spectrina-proteina 4:1. La ridotta deformabilità eritrocitaria è dovuta non solo a variazione della geometria cellulare con riduzione del rapporto superficie/volume, ma anche ad aumento della viscosità citoplasmatica.

Ellissocitosi

Il difetto molecolare che determina l'alterazione morfologica degli eritrociti può riguardare sia le proteine del citoscheletro che le proteine che ancorano il citoscheletro alla membrana. Sono stati descritti un deficit quantitativo e qualitativo (catena proteica più corta) della proteina 4:1, alterazioni a carico della spectrina (interessanti sia la catena α che quella β), difettoso legame dell'ankirina alla proteina della banda 3.

Come nella sferocitosi, il disordine reologico più evidente è la ridotta deformabilità eritrocitaria, con variazione della permeabilità della membrana al potassio e al calcio.

Altre emoglobinopatie

Sono segnalate alterazioni emoreologiche in soggetti con anemia emolitica congenita di gravità variabile, riconducibili ad alterazioni strutturali dell'emoglobina che ne riducono la solubilità e la stabilità. Negli eritrociti tali emoglobine instabili, in forma denaturata, precipitano con formazione di aggregati (corpi di Heinz), che alterano la deformabilità della cellula.

Bibliografia essenziale

1. Dintenfass L. *Blood microrheology*. Viscosity factors in blood flow, ischaemia and thrombosis. London: Butterworths; 1976.
2. Di Perri T, Giotti A, Lenti G, Neri Serneri GG, Schmid-Schonbein H (Ed.). XIII Capri Conference. Blood rheology and microcirculation. *La Ricerca in Clinica e Laboratorio* 1980; 11(suppl.1).

3. Lowe GDO, Drummond MM, Forbes CD, Barbenel JC. Occlusive arterial disease and blood rheology. In: Lowe GDO, Barbenel JC, Forbes CD (Ed.) *Clinical aspects of blood viscosity and cell deformability*. Berlin: Springer Verlag; 1981. p. 133-148.
4. Forconi S, Carandente O (Ed.). Atti del I Congresso Nazionale della Società Italiana di Emoreologia. *La Ricerca in Clinica e Laboratorio* 1983; vol. 13(suppl.3).
5. Di Perri T, Forconi S, Di Lollo F, Pozza G. Le sindromi da iperviscosità ematica. In: *Atti dell'84° Congresso della Società Italiana di Medicina Interna*. Roma: Pozzi; 1983. p. 193-310.
6. Pozza G, Carandente O (Ed.). Emoreologia in laboratorio ed in clinica. Atti del II Congresso Nazionale della Società Italiana di Emoreologia. *La Ricerca in Clinica e Laboratorio* 1985; 15(suppl.1).
7. Dintenfass L. *Blood viscosity, hyperviscosity & hyperviscosaemia*. Lancaster: MTP Press; 1985.
8. Chien S, Dormandy J, Ernst E, Matrai A (Ed.). *Clinical hemorheology*. Dordrecht: Nijhoff; 1987.
9. Lowe GDO (Ed.). *Clinical blood rheology*. Boca Raton: CRC Press; 1988.
10. Neri Serneri GG, Gensini GF (Ed.). Atti del III Congresso Nazionale della Società Italiana di Emoreologia. *La Ricerca in Clinica e Laboratorio* 1989; 19(suppl.1).
11. Di Perri T. (Ed.). *Atti del IV Congresso Nazionale della Società Italiana di Emoreologia*. Chester (England): Adis International; 1991
12. Lowe GDO. Blood viscosity and cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 1992;65:494-8.
13. Schmid-Schönbein GW. The damaging potential of leukocyte activation in the microcirculation. *Angiology* 1993;44:45-56.
14. Caimi G (Ed.) Atti del V Congresso Nazionale della Società Italiana di Emoreologia Clinica. Milano: McGraw-Hill; 1994.
15. Laghi Pasini F, Capecchi PL, Di Perri T. Utilità della misurazione della viscosità ematica e plasmatica nella valutazione dei pazienti arteriopatici. *Min Cardioangiol* 1998;46:109-117.

LA FORMAZIONE DEL TROMBO PIASTRINICO IN CONDIZIONI DI FLUSSO

Mario Mazzucato

Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio e per Immagini, Struttura Operativa "Attività Immunotrasfusionale relativa alle Alte Dosi di Chemioterapia", Centro Ricerca Oncologica IRCCS Aviano (PN)

Il sangue in movimento lungo il vaso è classicamente caratterizzato da un insieme di lamine fluide che scivolano una sopra l'altra con graduale crescente velocità dalla parete vasale all'asse centrale del lume. La differenza di velocità tra lamine adiacenti è definita come *shear rate* (s^{-1}), e la forza che agisce tra loro *shear stress* ($dynes/cm^2$). Poiché la differenza di velocità tra le lamine è massima alla parete vasale, *shear rate* e *shear stress* sono massimi in vicinanza allo strato endoteliale, che costituisce il ricoprimento endoluminale del vaso sanguigno. *Shear rate* e *shear stress* variano moltissimo nel sistema arterioso, soprattutto nelle condizioni in cui la presenza di placche arteriose e restringimenti endoluminali variano la caratteristica geometria del vaso, con una riduzione netta del diametro transluminale, lo sconvolgimento della struttura laminare del flusso e la comparsa di aree di ricircolo, separazione di flusso e flusso turbolento. Distorsioni patologiche del flusso favoriscono l'insorgenza di fenomeni trombotici (Figura 1).

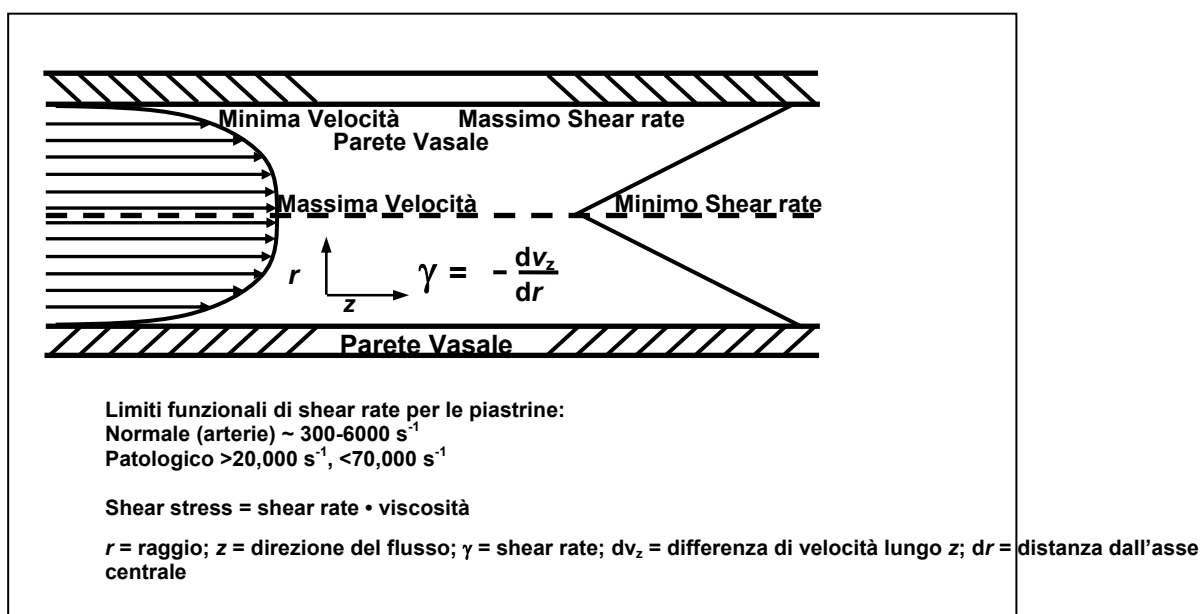


Figura 1. Rappresentazione schematica delle caratteristiche del flusso arterioso

Le piastrine, cellule ematiche prive di nucleo originate dal citoplasma dei megacariociti midollari, contribuiscono a conservare la normale circolazione del sangue attraverso il mantenimento dell'integrità vascolare. La formazione del trombo piastrinico è un necessario

meccanismo di difesa in risposta ad una lesione in modo da prevenire l'emorragia, ma può determinare un evento francamente patologico, rilevante in quanto a morbidità e mortalità, quando provoca una occlusione arteriosa acuta come l'infarto del miocardio (1). Le piastrine devono essere in grado di discriminare tra l'endotelio normale e le aree di lesione. La deposizione piastrinica nell'area di lesione, in condizioni di flusso, è un processo che richiede fasi successive (2) che coinvolgono a) il trasporto delle piastrine lungo il flusso ematico, b) una fase reversibile di adesione, c) l'attivazione piastrinica indotta dagli effetti dello scorrimento del sangue e dalla presenza di agonisti solubili, d) adesione stabile, e) aggregazione piastrinica.

In conseguenza del loro moto erratico e della loro migrazione laterale, gli eritrociti occupano la maggior parte del lume, spingendo globuli bianchi e piastrine verso le pareti vasali con conseguente creazione di un eccesso di piastrine in prossimità della parete stessa. Su scala macroscopica, questo movimento corrisponde alle collisioni intermolecolari tipiche del moto Browniano. Il coefficiente di diffusione effettiva delle piastrine nel plasma, in presenza di globuli rossi, aumenta di due ordini di grandezza, rispetto al semplice caso di moto Browniano, da 10^{-9} a 10^{-11} m²/s (3, 4).

Le piastrine possono muoversi liberamente all'interno del sottile strato, in prossimità della parete, dove sono maggiormente concentrate. È necessario, infatti, che le piastrine siano in stretta prossimità alla parte arteriosa per interagire con essa. L'adesione piastrinica si manifesta nonostante la dirompente tendenza del flusso sanguigno a trascinare via le piastrine adese. Questa forza di trascinamento (*drag*) cresce all'aumentare del flusso, che viene usualmente quantificato in termini di *shear rate*, γ . In prossimità dell'endotelio le piastrine si trovano quindi in uno stato di "equilibrio spaziale" determinato da forze repulsive, dovute alla carica elettronegativa posseduta sia dalle piastrine che dalla membrana delle cellule endoteliali, forze attrattive di van der Waals e forze che ne determinano l'allontanamento lungo la direzione del flusso (*drag*) (Figura 2).

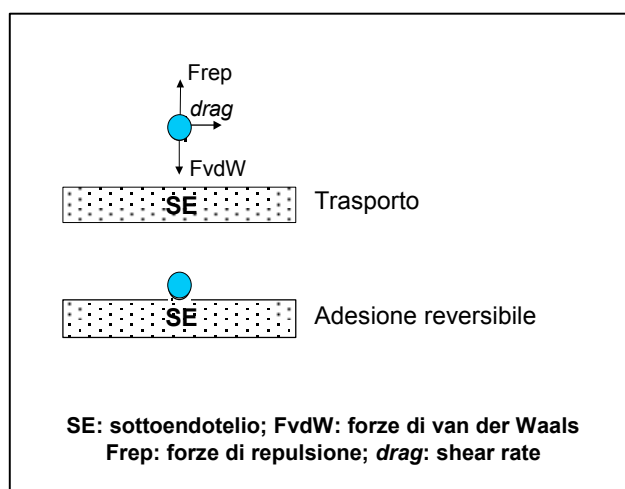


Figura 2. Forze che condizionano l'adesione piastrinica

Su scala submicroscopica, le molecole associate rispettivamente con la membrana delle piastrine e delle cellule endoteliali tendono ad essere separate da uno strato plasmatico.

Non possono interagire le une con le altre finché la distanza di separazione è maggiore di 100 nm (5). Per valori inferiori, veri e propri legami intermolecolari possono formarsi.

Per far avvenire questo è necessario perturbare l'equilibrio di forze che regola la presenza dello strato di piastrine in prossimità della parete vasale e questo avviene quando il sottoendotelio è esposto nella parte endoluminale del vaso ematico. La presenza di molecole attrattive nella matrice sottoendoteliale esposta al flusso ematico è una condizione fondamentale per provocare l'adesione piastrinica alla parete vasale. Una molecola puramente attrattiva è stata recentemente individuata nel proteoglicano della parete arteriosa *Versicano*, precisamente l'isoforma V1/V2. Il *Versicano* V1/V2, largamente espresso nella placca aterosclerotica erosa (6), è in grado di attrarre le piastrine nel luogo del danno vascolare, specialmente dove persistono flussi perturbati. La presenza del *Versicano* V1/2 aumenta di gran lunga la capacità trombogenica del collagene I (7).

In dipendenza dalla profondità della lesione le piastrine possono venire in contatto differenti sostanze che costituiscono la matrice extracellulare, alcune secrete in loco e proprie della matrice, altre provenienti dal plasma come nel caso del fattore di von Willebrand (VWF) che si lega al collagene. Il fattore di von Willebrand gioca un ruolo determinante nella risposta al danno vascolare, rappresentando un'interfaccia citoadesiva estremamente efficiente tra la matrice sottoendoteliale e i recettori della membrana piastrinica. Il VWF possiede sia capacità attrattive che attivatorie nei confronti delle piastrine. La sua molecola polimerica possiede specifiche proprietà biomeccaniche che gli conferiscono particolari capacità citoadesive, in funzione delle forze idrodinamiche presenti nel vaso. Infatti, un cambiamento conformazionale, determinato dalle forze idrodinamiche, della molecola del VWF legato ad una superficie può aumentare il numero dei siti di legame (dominio A1 del VWF (A1VWF)) per il suo recettore piastrinico (GPI α) (8). Inoltre il VWF può ancora incrementare la disponibilità di legami con le glicoproteine recettoriali della membrana piastrinica, attraverso un processo reversibile di auto-associazione tra le sue molecole circolanti e quelle immobilizzate sulla superficie (9).

Una volta aderite, le piastrine, circondate dal plasma che tende a trascinarle via nella direzione del flusso, sono soggette ad una combinazione di forze risultanti dalla loro forma approssimativamente lenticolare e dalla presenza di punti d'attacco sulla superficie (legami ligando-recettore), che tendenti produrre un moto di rotazione (momento torcente). Le proprietà micromeccaniche dei legami e, quindi, la loro resistenza alla tensione (nella parte caudale della piastrina, in relazione alla direzione del flusso) sono una diretta conseguenza dell'architettura tridimensionale e della struttura chimica delle molecole coinvolte. La tensione meccanica del legame tra il A1VWF e il suo recettore di membrana piastrinico GPI $\beta\alpha$ è convertita in risposta biochimica che produce attivazione piastrinica e successiva esposizione in forma funzionalmente attiva dell'integrina piastrinica $\alpha_{IIb}\beta_3$. Il successivo ingaggio tra l'integrina piastrinica e la sequenza RGD del VWF portano all'adesione irreversibile. Il rilascio di agonisti solubili incrementano il livello di attivazione piastrinica e ne favoriscono l'aggregazione (10). Distinti aumenti di Ca^{++} citosolico sono associati con le fasi sequenziali di attivazione. In particolare, l'adesione reversibile-attivazione dipendente dalla stimolazione della GPI $\beta\alpha$ piastrinica è associata al rilascio del Ca^{++} dai depositi interni (picchi di Ca^{++} classificati come " α/β "), mentre l'adesione irreversibile $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dipendente comporta in larga parte un flusso di Ca^{++} proveniente dall'ambiente extracellulare (picchi γ) (11) (Figura 3).

Affinché il VWF possa offrire un'adeguata superficie adesiva per trattenere le piastrine nella zona di lesione vascolare in opposizione alle forze di scorrimento che ne produrrebbero l'allontanamento, occorre che il VWF stesso sia "ancorato" alla matrice extracellulare. I collagene di tipo I e III (Col I/III) possiedono alta capacità legante il VWF e sono stati proposti come naturali ligandi per il VWF solubile (12, 13). L'attuale conoscenza circa l'organizzazione topografica della matrice extracellulare (*ExtraCellular Matrix*, ECM) potrebbe suggerire una capacità di legare il VWF da parte dei Col I/III piuttosto limitata.

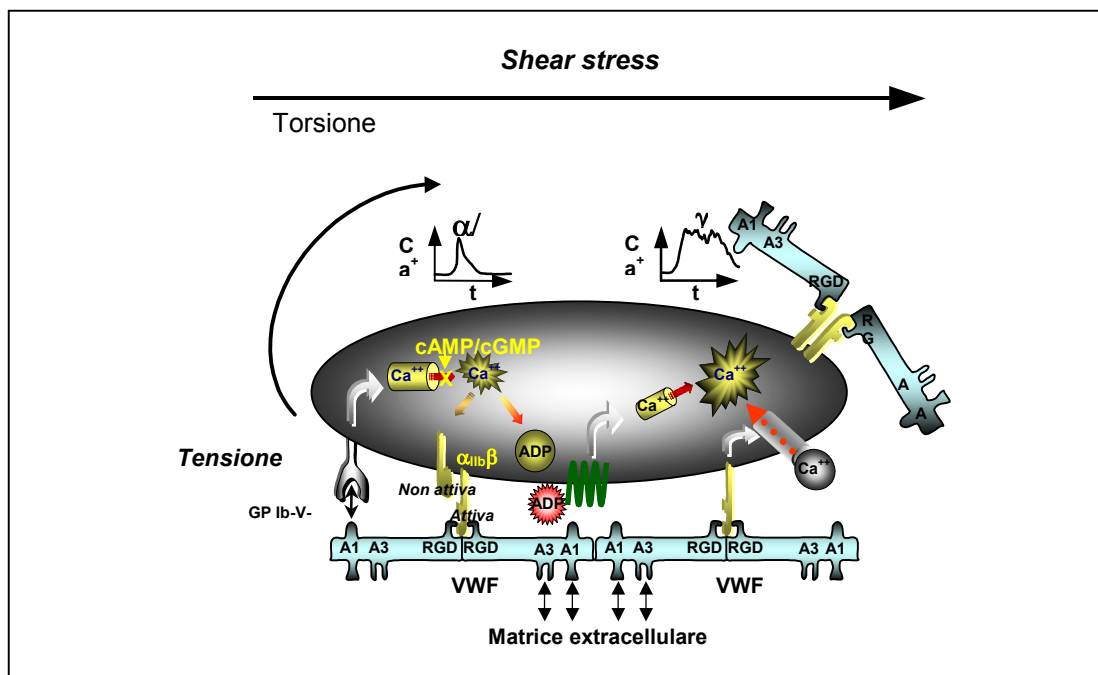


Figura 3 Attivazione shear-dipendente

Questo è dovuto al fatto che la rete di fibrille collageniche potrebbero non essere direttamente accessibili al VWF circolante, almeno per soluzioni di continuo poco profonde. Le fibrille di Col I/III sarebbero fisicamente separate dal sottoendotelio da una rete di microfilamenti e coperte da decorina. Al contrario il Collagene VI (Col VI), un elemento primario della rete microfilamentosa, può rappresentare un più idoneo ligando subendoteliale per il VWF, peraltro mediante un complesso sistema di ancoraggio che prevede l'interazione simultanea dei domini A1 e A3 del VWF, dell'integrità strutturale del Col VI, e della piena funzione recettoriale piastrinica (GPIIb, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, GPVI) (14).

Il processo dell'adesione piastrinica nell'area di lesione, in condizioni fisiologiche di flusso ematico, è strettamente regolato dall'interazione tra substrati adesivi (von Willebrand, collageni, proteoglicani, ecc.) e i rispettivi recettori piastrinici funzionalmente competenti. Superfici con differenti caratteristiche strutturali (dipendente dal distretto vascolare e dalla profondità della lesione) inducono l'adesione attraverso specifiche interazioni con i recettori di membrana piastrinica, assolutamente in dipendenza dalle forze meccaniche determinate dal flusso ematico e definite come parametri emodinamici. In altre parole, le condizioni emodinamiche e le caratteristiche dei substrati citoadesivi definiscono le modalità dell'adesione piastrinica, determinando un adattamento del processo emostatico a varie situazioni fisio-patologiche e finalizzato al controllo dell'emorragia nei differenti distretti vascolari.

Bibliografia

1. Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Sem Thromb Hemost* 2000; 26: 463-78.
2. Ruggeri ZM. Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation. *J Clin Invest* 2000; 105: 699-701.

3. Goldsmith HL, Turitto VT. Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thromb. Haemost. *Thrombosis and Haemostasis* 1986; 55: 415-435.
4. Goldsmith HL, Bell DN, Spain S, McIntosh FA. Effect of red blood cells and their aggregates on platelets and white cells in flowing blood. *Biorheology* 1999; 36: 461-468.
5. Ruggeri ZM, Saldivar E. *von Willebrand factor and the mechanism of platelet function*. Springer-Verlag and R.G. Landes Company; 1998.
6. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Wight TN, Virmani R. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1642-1648.
7. Mazzucato M, Cozzi MR, Pradella P, Perissinotto D, Malmstrom A, Morgelin M, Spessotto P, Colombatti A, De Marco L, Perris R. Vascular PG-M/versican variants promote platelet adhesion at low shear rates and cooperate with collagens to induce aggregation. *FASEB J* 2002; 16:1903-1916.
8. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant K, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. Shear-dependent changes in the three dimensional structure of human von Willebrand Factor. *Blood* 1996; 88:2939-2950.
9. Savage B, Sixma JJ, Ruggeri Z.M. Functional self-association of von Willebrand factor during platelet adhesion under flow. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99:425-430.
10. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand Factor. *Cell* 1996; 84: 289-297.
11. Mazzucato M, Pradella P, Cozzi MR, De Marco L, Ruggeri ZM. Sequential cytoplasmatic calcium signals in a two-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ib α mechanoreceptor. *Blood* 2002;100:2793-2800.
12. Moroi M, Jung SM, Nomura S, Sekiguchi S, Ordinas A, Diaz-Ricart M. Analysis of the involvement of the von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow condition. *Blood* 1997; 90; 4413-4424.
13. Barnes MJ, Knight GC, Farndale RW. The collagen-platelet interaction. *Curr Opin Hematol* 1998; 5:314-320.
14. Mazzucato M, Spessotto P, Casotti A, De Apollonia L, Cozzi MR, Yoshioka A, Perris R, Colombatti A, De Marco L. Identification of domains responsible for von Willebrand factor type VI collage interaction mediating platelet adhesion under high flow. *J Biol Chem* 1999; 274:3033-3041.

ALTERAZIONI EMOREOLOGICHE NELL'ANEMIA FALCIFORME

Paolo Cianciulli

Day Hospital Anemie Congenite, Ospedale S. Eugenio, Roma

Introduzione

L'anemia falciforme è l'emoglobinopatia più frequente al mondo. Si calcola che nel mondo esistano più di tre milioni di portatori eterozigoti. Studi condotti sul genoma umano hanno permesso di datare la comparsa di questa mutazione a circa quattromila anni orsono apparendo la prima volta in Africa centro-orientale e in India. Successivamente per ragioni geo-politiche la malattia si è diffusa in tutto il mondo. Malattia autosomica recessiva è causata da una mutazione del DNA che codifica la beta globina. Questa comporta la sostituzione dell'aminoacido acido glutammico con un altro aminoacido: la valina. Il cambiamento porta a modificazioni stechiometriche della molecola della beta globina con interazione tra regioni idrofobiche di catene beta S globiniche (1). L'emoglobina S (HbS) è una emoglobina a bassa affinità per l'ossigeno causa di un danno di membrana che si esplicita con un aumento di permeabilità e perdita di $K^+/Cl^-/H_2O$, con successiva disidratazione e formazione di cellule predisposte alla falcizzazione. Le alterazioni biochimiche della membrana cellulare riguardano la componente lipidica (2), quella proteica (3) e il ferro depositato lungo la membrana cellulare (4). Tali alterazioni ne alterano il comportamento reologico (5, 6). La viscosità ematica nella anemia falciforme è alterata per diversi motivi: alterazione della viscosità plasmatica, alterazioni del comportamento reologico della membrana del globulo rosso, ridotta velocità di flusso nel microcircolo per incapacità a formare rouleaux, tendenza alla polimerizzazione della HbS.

Scopo della ricerca è quello di studiare le possibili cause della Crisi Vaso-Occlusiva (CVO), momento fondamentale nella comprensione della fisiopatologia della malattia.

Materiali e metodi

Sono stati esaminati otto pazienti affetti da Anemia falciforme (2 HbS/HbS; 6 HbS/Tal), 5 di sesso maschile e 3 di sesso femminile. Di essi cinque Trasfusione-Dipendenti (TD) per pregressi fenomeni ischemici e/o tromboembolici e tre Non Trasfusione-Dipendenti (NTD). Nessun paziente era stato splenectomizzato. Sette pazienti erano in trattamento con aspirina o dipiridamolo e con acido folico. Una sola paziente era in trattamento da tre anni con Idrossiurea. I prelievi erano eseguiti in un periodo compreso tra 7 e 28 giorni dall'ultima trasfusione. Tutti i pazienti erano stati sottoposti ad esame del DNA per la ricerca di concomitante alfa talassemia e/o attivazione dei geni γ (fattori mitiganti), a studio coagulativo di base e dei fattori genetici trombofilici, ad esame elettroforetico delle proteine della membrana del globulo rosso e a studio della viscosità ematica rotazionale e della viscoelasticità valutata mediante *strain* e *frequency test*.

I dati clinici sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1. Pazienti: dati clinici e assetto emoglobinico

Pazienti (n.)	Età media alla diagnosi (anni)	Età media (anni)	HbS (%) (valore medio)	HbF (%) (valore medio)
TD =5	7,8 ± 7 (1-18)	39 ± 16 (23-62)	29 ± 8,1	5 ± 3,2
NTD =3	18,3± 15,2 (2-22)	33 ± 3,2 (31-37)	67 ± 1	7,8 ± 12,3

± = Deviazione Standard; () = range

Risultati

Nessuno dei pazienti esaminati presentava attivazione dei geni γ , mentre tre pazienti (2 TD e 1 NTD) presentavano concomitante trait alfa talassemico ($\alpha^{-3.7}$). Nei TD il vWF: Ag era più elevato che nei NTD (P 0,03). Inoltre in tutti i pazienti esaminati le mutazioni trombofiliche maggiormente riscontrate erano quelle relative alla omocisteina (C677T; A1298C), variamente combinate con altri difetti congeniti in condizioni di eterozigosi singola o mista o di omozigosi. Le proteine della membrana cellulare presentavano alterazioni quali/quantitative non di rilievo. La globina precipitata era in quantità abnorme nelle forme trasfusioni-dipendenti. In tutti i casi esaminati inoltre si assisteva a variazioni della viscosità ematica e della viscoelasticità. I casi paradigmatici presentati (paziente n. 3 e n. 8) rappresentano gli estremi di una popolazione: il paziente n. 3 (TD) a bassa *compliance* farmacologia e la paziente n. 8 (NTD) in trattamento farmacologico da vari anni. Nel primo si ha un danno a medio e basso *shear* (macrocircolo), nell'altro un danno a medio e alto *shear* (microcircolo). Nella paziente n.8 in regime oscillatorio si nota una tendenza alla normalizzazione dei parametri G1 e G2 per probabile effetto della terapia con Idrossiurea (Figure 1-4).

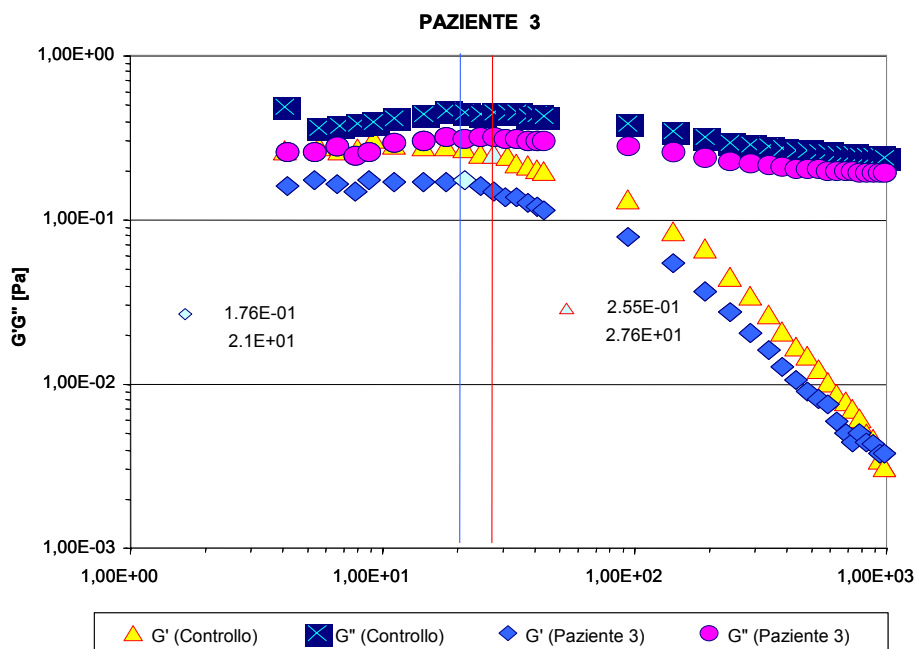


Figura 1. Strain Test: paziente n. 3

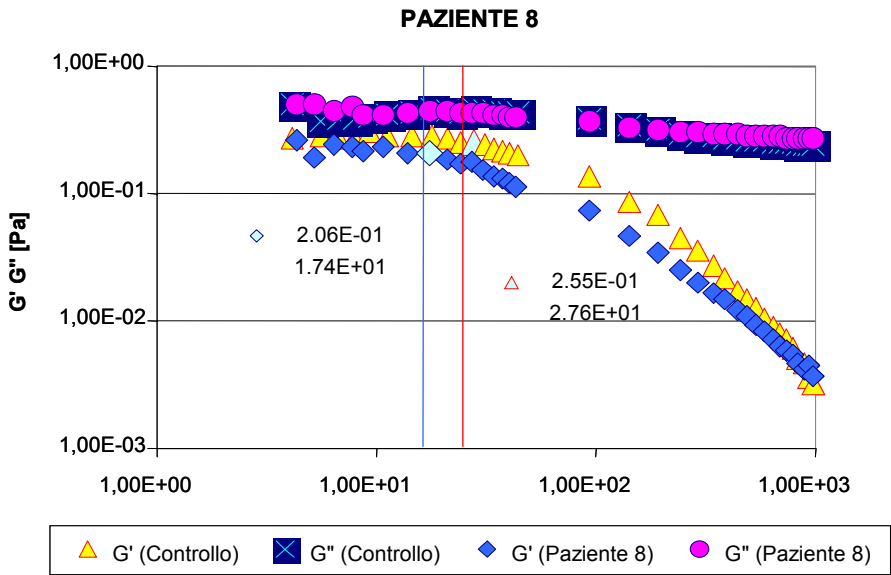


Figura 2. *Strain Test*: paziente n. 8

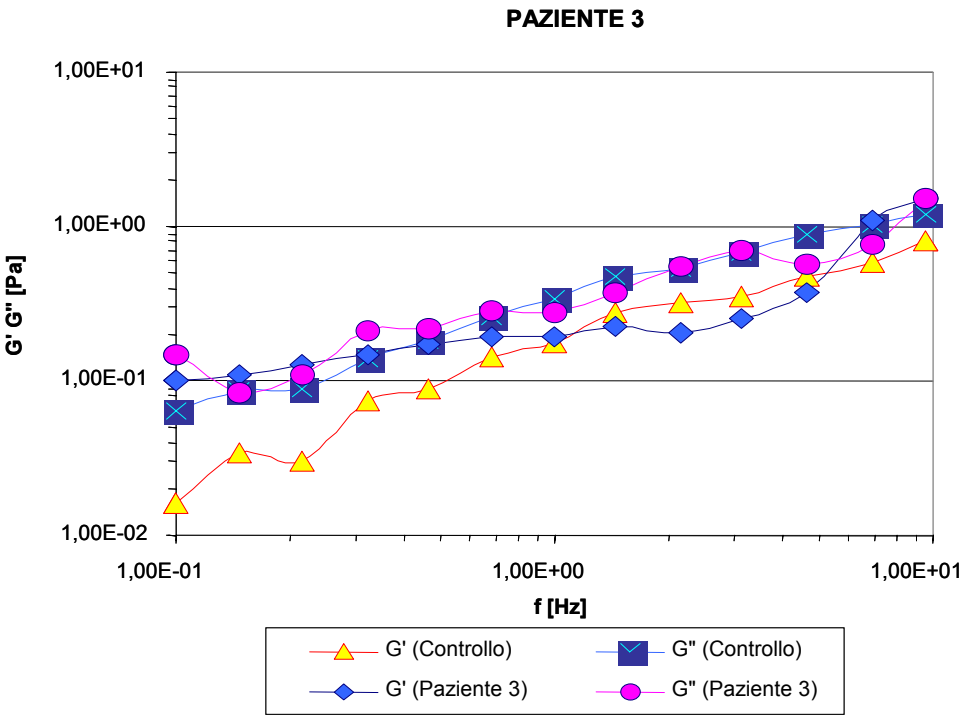
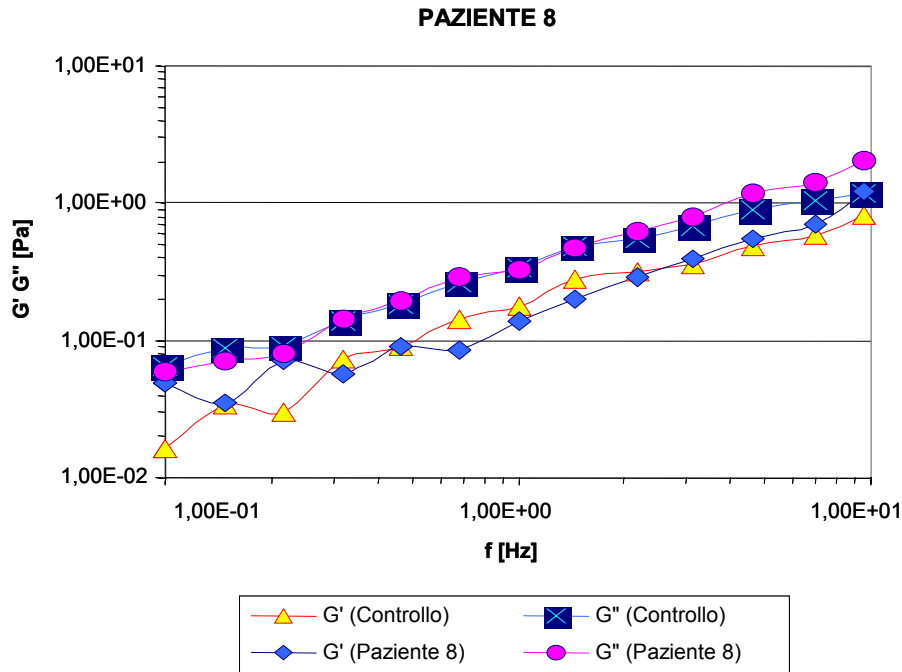


Figura 3. *Frequency Test*: pazienti n. 3



Conclusioni

La CVO è sostenuta da numerose cause: alterazioni emoreologiche e della reologia della membrana del globulo rosso, da alterazioni quali-quantitative delle proteine del citoscheletro e da alterazioni dello stato coagulativo in senso protrombotico.

Bibliografia

1. Nagel RL, Johnson J, Bookchin RM, Garel MC, Rosa J, Schilirò G, Wajcman H, Labie D, Moo-Penn W, Castro O. Beta-chain contact sites in the haemoglobin S polymer. *Nature* 1980; 283:832-4.
2. Condor WE, Lin DS, Thomas G, Ey F, DeLoughery T, Zhu N. Abnormal phospholipids molecular species of erythrocytes in sickle cell anemia. *J Lipid Res* 1997; 12:2516-28.
3. Corbett JD, Golan DE. Band 3 and glycophorin are progressively aggregated in density-fractionated sickle and normal red blood cells. Evidence from rotational and lateral mobility studies. *J Clin Invest* 1993; 91:208-17.
4. Browne P, Shalev O, Hebbel RP. The molecular pathobiology of cell membrane iron: the sickle red cell as a model. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1040-8.
5. Morse PD, Warth JA. Direct measurement of the internal viscosity of sickle erythrocytes as a function of cell density. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1053: 49-55.
6. Dong C, Chadwick RS, Schechter AN. Influence of sickle hemoglobin polymerization and membrane properties on deformability of sickle erythrocytes in the microcirculation. *Biophys J* 1992; 63:774-83.

ALTERAZIONI EMOREOLOGICHE NEI PAZIENTI UREMICI

Marco Ballestri, Federica Ferrari, Paolo Manfredini, Giulia Ligabue, R. Magistroni, Alberto Albertazzi
*Divisione e Cattedra di Nefrologia Dialisi e Trapianto renale, Azienda Policlinico di Modena,
Università di Modena e Reggio Emilia*

Introduzione

La progressione dell'insufficienza renale comporta una graduale perdita dell'omeostasi idro-elettrolitica e acido-base, squilibri endocrini, ritenzione di prodotti terminali del metabolismo proteico e altri cataboliti, squilibrio fra agenti ossidanti e antiossidanti e conduce progressivamente all'uremia. È questa una sindrome sistemica caratterizzata da disfunzioni a carico di tutti gli apparati, che può essere corretta solo parzialmente e periodicamente dall'emodialisi consentendo comunque la sopravvivenza dell'individuo. Nei pazienti emodializzati risulta particolarmente elevata l'incidenza di malattie cardiovascolari, che rappresentano la prima causa di morte in questo gruppo di persone (1).

Nella sindrome uremica sono state descritte anche alterazioni emoreologiche (2-5) e in particolare:

- aumento della viscosità plasmatica (η_P) e della aggregabilità eritrocitaria, dovute agli elevati livelli di fibrinogeno e α -globuline (α -G) tipici di questi soggetti;
- ridotta deformabilità eritrocitaria (DE) a probabile genesi multifattoriale (iperparatiroidismo e aumento del calcio intracellulare, ossidazione dei lipidi di membrana, tossine uremiche, acidosi metabolica, disfunzione endoteliale, sovraccarico di alluminio, ecc.).

Non sono invece riportate sostanziali alterazioni della viscosità del sangue intero (η_S), poiché l'incremento di quest'ultima viene limitato dai ridotti valori di ematocrito (Ht) che accompagnano l'uremia.

I dati disponibili in letteratura sono però ricavati da studi condotti su casistiche limitate, in assenza di standardizzazione delle metodiche e delle modalità operative utilizzate. Infatti per misurare gli stessi parametri sono stati impiegati viscosimetri, reometri, difrattometri, metodiche di filtrazione e addirittura osservazioni morfologiche in microscopia ottica e/o elettronica. Anche le modalità di raccolta e processazione dei campioni sono risultate molto eterogenee, così come le principali condizioni di misura, quali temperature e *shear rate* (ShR) applicati. Si giustifica perciò la discordanza dei dati forniti e risulta impossibile confrontare i dati dei diversi studi per trarne conclusioni definitive.

Abbiamo voluto studiare le caratteristiche emoreologiche dei pazienti uremici in trattamento emodialitico in una casistica più ampia, attenendoci il più possibile alle istruzioni operative fornite dal Comitato Internazionale per la Standardizzazione in Ematologia (*International Council for Standardization in Haematology*, ICSH) (6), e le abbiamo confrontate con una popolazione di riferimento. Infine, sono stati valutati gli effetti esercitati dalla dialisi, dalle diverse membrane dialitiche, dal paratormone e dalla somministrazione di eritropoietina sulle proprietà emoreologiche degli emodializzati.

Materiali e metodi

Sono stati reclutati 90 pazienti uremici (40% per nefroangiosclerosi, 16% per glomerulonefriti, 14% per nefropatia diabetica, 12% per rene policistico, 10% per pielonefrite, 8% per malattie rare o eziologia non identificata) con età dialitica ≥ 12 mesi e 29 volontari in apparente buona salute e in assenza di qualsiasi trattamento farmacologico. Dal campione degli uremici sono state escluse le persone affette da patologie emolinfoproliferative. La Tabella 1 descrive le popolazioni studiate.

Tabella 1. Caratteristiche delle popolazioni studiate

Caratteristica	Controlli	Emodializzati
Numero	29	90
Età (anni)	$42 \pm 8,8$	69 ± 15
Maschi/femmine	18/11	55/35

Per la raccolta e l'analisi dei campioni abbiamo seguito le indicazioni ICSH. Sono stati eseguiti i comuni esami di routine dei pazienti uremici e l'Ht è stato controllato con micrometodo capillare. Le misure di viscosità sono state eseguite con reometro (Haake RV20, sistema Couette CV100, sensore ZB15, Haake, Germany) termostato a 37 °C.

Per misurare la η_P è stato applicato uno ShR di $300s^{-1}$, previa separazione del plasma mediante centrifugazione a 900 g per 5 minuti.

Al sangue intero sono stati applicati ShRs di 200 ($\eta_{S_{200}}$) e $1 s^{-1}$ (η_{S_1}) e l'interfaccia aria-sangue nel dispositivo di misura è stato isolato mediante sovrapposizione di 15 μl di olio silconico. Le misurazioni sono state effettuate utilizzando 1200 μl di sangue all'Ht nativo, quindi corrette per un Ht standard 40% ($\eta_{S_{1[40]}}$ e $\eta_{S_{200[40]}}$), utilizzando il metodo Martorana-Mojoli (7). È stato quindi calcolato l'Indice di Aggregazione Eritrocitaria (IAE) come rapporto fra viscosità del sangue a basso ShR (hS_1) e ad alto ShR (hS_{200}).

La DE è stata stimata calcolando il fattore di Taylor (Tk), secondo la relazione: $Tk = 1 - (\eta_P/\eta_{S_{200}})^{0.4}/Ht$. Questo metodo presenta il vantaggio di valutare le emazie sospese nel loro plasma di origine, tenendo conto di tutte le influenze esercitate su di esse da citokine, ormoni, ioni, metaboliti e agenti ossidanti in esso contenuto. Conservare il contributo di questi fattori è indispensabile per la valutazione della DE nei pazienti uremici, non essendo ancora chiari i meccanismi attraverso i quali l'uremia deteriora le proprietà reologiche delle emazie.

Con il modello reologico di Casson (8) abbiamo ricavato il limite di scorrimento del sangue ($C\tau_0$), corrispondente allo sforzo necessario per rompere i legami fra le particelle sospese (nel nostro caso le cellule ematiche) e fare iniziare lo scorrimento della sospensione.

Abbiamo infine studiato le proprietà viscoelastiche del sangue in regime oscillatorio applicando una deformazione dell'8% a frequenza variabile fra 0,46 e 4,63 Hz (corrispondenti a 27-277 deformazioni/minuto), rimanendo così nel range della frequenza degli impulsi impartiti alle emazie dal battito cardiaco. La deformazione 8%, al limite del campo di linearità viscoelastica, è stata imposta dalla sensibilità dello strumento a nostra disposizione. Sono stati valutati i moduli elastico e viscoso e l'angolo di sfasamento, che caratterizza il comportamento viscoso o elastico del materiale in esame.

Risultati

La Tabella 2 riassume il risultato delle misure ottenute. La ηP è risultata aumentata negli uremici, seppure a valori ancora entro il range di riferimento del nostro laboratorio (che è $1,4 \pm 0,22$ mPa s), mentre dopo dialisi sale a valori francamente patologici. Come atteso, i valori di ηP sono risultati correlati ai livelli di α -G e fibrinogeno e i coefficienti di correlazione sono risultati più prossimi ad 1 dopo dialisi.

La ηS_{200} è risultata ridotta negli uremici e aumentata dopo dialisi, pur rimanendo entro valori di norma. La $\eta S_{200[40]}$ è risultata invece più elevata, sia pre che post-dialisi.

La ηS_1 è apparsa aumentata negli uremici rispetto ai controlli, e ancora di più dopo la seduta emodialitica. I valori di $\eta S_{1[40]}$ sono risultati ancora più elevati e non influenzati dalla seduta emodialitica.

L'IAE degli uremici è risultato circa il doppio di quello dei controlli, indicando che le emazie degli uremici a basso *shear rate* sono almeno 6 volte più aggregate di quando il sangue scorre ad alto *shear rate*. Anche questo parametro non sembra venire corretto dalla dialisi.

Il $C\tau_0$ è aumentato negli emodializzati rispetto ai volontari sani e non viene influenzato significativamente dalla dialisi. $C\tau_0$ è risultato correlato positivamente con l'IAE e con la ηS_1 ($p < 0,0001$, r 0,9).

Tabella 2. Alterazioni emoreologiche nei pazienti uremici

Parametro	Unità	Controlli (#)	Pre-dialisi (\$)	Post-dialisi (&)	# ≠ \$ <i>p</i>	\$ ≠ & <i>p</i>	# ≠ & <i>p</i>
ηP	mPa s	$1,45 \pm 0,2$	$1,57 \pm 0,1$	$1,80 \pm 0,3$	0,01	< 0,001	< 0,001
ηS_{200}	mPa s	$4,25 \pm 0,5$	$3,47 \pm 0,4$	$4,06 \pm 0,8$	< 0,001	< 0,001	ns
$\eta S_{200[40]}$	mPa s	$3,86 \pm 0,4$	$4,74 \pm 1,0$	$4,93 \pm 1,0$	< 0,001	0,004	< 0,001
ηS_1	mPa s	$15,4 \pm 5,4$	$23,9 \pm 10$	$28,2 \pm 14$	0,001	< 0,001	< 0,001
$\eta S_{1[40]}$	mPa s	$13,9 \pm 4,5$	$26,4 \pm 11$	$26,8 \pm 11$	< 0,001	ns	< 0,001
IAE		$3,61 \pm 1,0$	$6,10 \pm 2,0$	$6,20 \pm 2,0$	< 0,001	ns	< 0,001
IAE _[40]		$3,50 \pm 1,0$	$6,73 \pm 0,2$	$6,50 \pm 2,0$	< 0,001	ns	< 0,001
$C\tau_0$	Pa	$0,11 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,08$	< 0,001	ns	< 0,001
Tk		$0,76 \pm 0,11$	$0,81 \pm 0,08$	$0,77 \pm 0,02$	0,01	< 0,001	ns

ns: non significativo

Il Tk, che è un indice di rigidità delle emazie, è risultato aumentato negli uremici prima della dialisi, mentre si corregge dopo dialisi. L'effetto sembra più evidente se si utilizzano membrane sintetiche ad alta biocompatibilità.

L'analisi delle proprietà viscoelastiche del sangue ha evidenziato un progressivo irrigidimento delle emazie all'aumentare della velocità di stimolazione, cosa che avviene anche nei controlli, ma ad un livello più basso, come documentato dall'andamento del modulo elastico G^I (dipendente essenzialmente dalle caratteristiche degli eritrociti) in Figura 1. L'andamento dell'angolo di sfasamento fra i moduli elastico e viscoso è illustrato in Figura 2 e conferma il comportamento più rigido delle emazie uremiche a tutte le frequenze di stimolazione (quando $d = 1^\circ$ la risposta del materiale in esame alla sollecitazione è puramente elastica, mentre quando $d = 90^\circ$ la risposta è del tutto viscosa: questo significa che l'energia applicata con la sollecitazione non viene restituita, ma assorbita e il materiale si deforma e scorre). Il trattamento dialitico migliora sensibilmente il comportamento dei globuli rossi, specialmente alle frequenze di stimolazione comprese fra 60 e 130 cicli/secondo (1 e 2,16 Hz), come dimostrato dall'abbassamento di G^I e dall'innalzamento di δ .

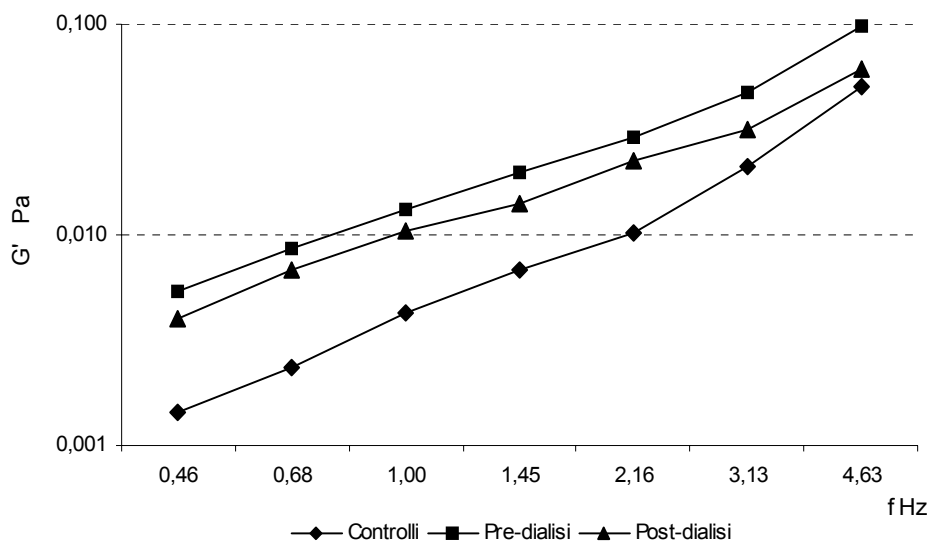


Figura 1. Andamento del modulo elastico G' a diverse frequenze di applicazione della deformazione

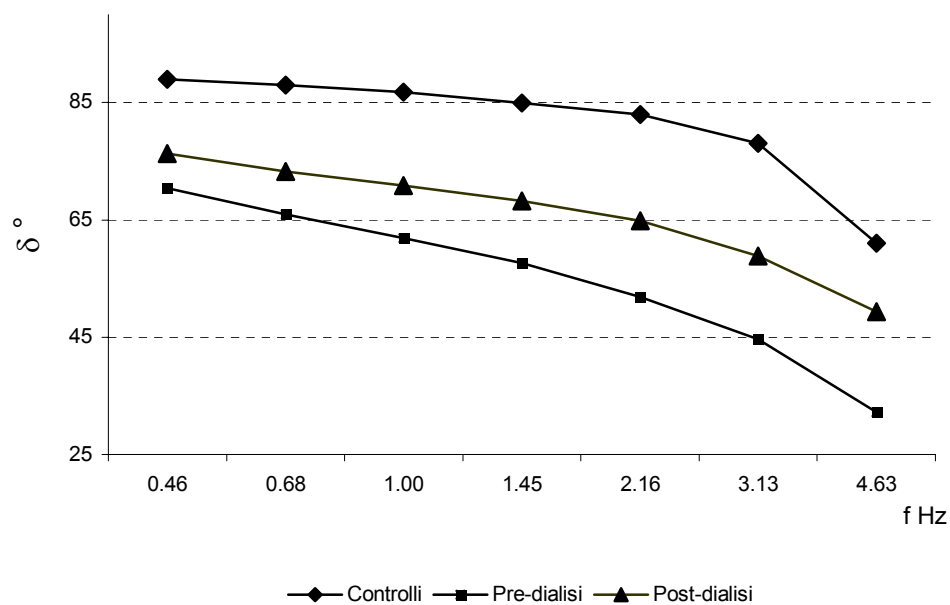


Figura 2. Andamento dell'angolo di sfasamento δ a diverse frequenze di applicazione della deformazione

Analizzando i parametri emoreologici dei pazienti uremici stratificati in base al tipo di membrana utilizzata per il trattamento dialitico sono state osservate differenze significative solo per quanto riguarda il Tk, migliorato mediamente del 3,7% circa con le membrane cellulose (acetato, di- e tri-acetato di cellulosa) e dell'8,6% circa con quelle sintetiche (polisulfone, poliamide e polimetilmetacrilato). Anche l'IAE si riduce sensibilmente con l'impiego di membrane sintetiche, ma senza significatività statistica (Tabella 3).

Tabella 3. Influenza della membrana di dialisi

Parametro	Membrane cellulose (n. = 40)	Membrane sintetiche (n. = 50)	p
Tk pre-dialisi	0,81 ± 0,09	0,81 ± 0,07	0,03
Tk post-dialisi	0,78 ± 0,07	0,74 ± 0,02	
Differenza Tk pre-post dialisi	0,03 ± 0,08	0,07 ± 0,08	
IAE pre-dialisi	6,70 ± 2,6	6,79 ± 3,4	ns
IAE post-dialisi	6,52 ± 2,6	6,45 ± 2,2	
Differenza IAE pre-post dialisi	0,17 ± 3,6	0,33 ± 2,3	

ns: non significativo

Stratificando i pazienti in base al trattamento con eritropoietina (EPO) è stato possibile identificare 2 gruppi di 42 e 48 pazienti, ricevuti rispettivamente < 4000 e ≥ 4000 UI di EPO alla settimana. Fra i 2 gruppi non vi erano differenze significative di sesso ed età. La somministrazione di eritropoietina è sembrata migliorare la ηP , la ηS_{200} e probabilmente la deformabilità delle emazie, come mostrerebbe l'andamento della viscosità relativa (ηR , rapporto fra ηS_{200} e ηP), che è un indice approssimativo di deformabilità eritrocitaria. Tuttavia le variazioni del Tk non hanno raggiunto la significatività statistica (Tabella 4).

Tabella 4. Influenza della terapia con EPO nei pazienti uremici

Parametro pre dialisi	Unità	EPO < 4000 UI/settimana	EPO ≥ 4000 UI/settimana	p
ηP	mPa s	1,66 ± 0,1	1,49 ± 0,2	< 0,001
$\eta S_{200[40]}$	mPa s	5,30 ± 1,0	4,26 ± 0,8	< 0,001
ηR		3,20 ± 0,5	2,92 ± 0,4	0,008
Tk		0,81 ± 0,07	0,80 ± 0,009	ns

ns: non significativo

Dei 90 pazienti studiati, 44 avevano livelli di PTH ≥ 120 pg/ml. L'utilizzo di questo cut-off per l'analisi statistica non ha evidenziato sostanziali differenze emoreologiche, a parte una ηR sensibilmente inferiore nei pazienti con PTH < 120 pg/ml (2,16 ± 0,3 *versus* 2,41 ± 0,4; p = 0,006).

Per tutti i parametri studiati non sono state evidenziate differenze significative fra i sessi e le classi di età. I dati relativi a quest'ultima analisi non sono però attendibili, considerata la scarsa rappresentanza di soggetti con età ≤ 45 anni e fra gli uremici e con età ≥ 46 fra i controlli.

Discussione

Per quanto riguarda la ηP si confermano i dati della letteratura che riportano negli uremici valori sensibilmente superiori ai controlli, in relazione agli elevati livelli di fibrinogeno e α -G tipici di questi soggetti. L'aumento della ηP dopo dialisi può essere attribuito principalmente alla disidratazione intradialitica con relativo aumento della concentrazione proteica plasmatica, ma non può essere escluso il contributo di proteine della fase acuta prodotte durante la seduta emodialitica. Questi fenomeni spiegherebbero anche l'aumento dell'indice di correlazione fra ηP , α -G e fibrinogeno dopo dialisi.

La ηS_{200} è risultata ridotta negli uremici, nonostante la ηP più alta, per effetto compensatorio dell'anemia e aumenta dopo dialisi principalmente per l'emoconcentrazione secondaria alla disidratazione intradialitica. Correggendo per un Ht standard si annulla l'effetto compensatorio dell'anemia e infatti valori di $\eta S_{200[40]}$ sono più elevati. Risulta quindi evidente come correzioni eccessive dell'anemia nei pazienti uremici possano avere effetti reologici assai sfavorevoli.

La ηS_1 , quindi a basso *shear rate*, è influenzata dall'aggregabilità eritrocitaria, è aumentata negli uremici e sale ancora dopo dialisi per l'emoconcentrazione. La $\eta S_{1[40]}$ è ancora più alta e l'effetto depurativo della dialisi non influenza il parametro. Come prevedibile, anche l'IAE è aumentato negli uremici. Questi valori di IAE e ηS_1 rendono ragione delle elevate resistenze nelle zone con flusso a basso ShR e possono spiegare alcuni fenomeni clinici di facile osservazione negli uremici, quali la rapida occlusione dell'accesso vascolare interno e il rapido sviluppo di acidosi metabolica in corso di ipotensione acuta, bradicardia o comunque situazioni di bassa portata.

Il $C\tau_0$ corrisponde alla forza necessaria per disaggregare la particelle in sospensione (nel nostro caso le cellule ematiche) e dare inizio allo scorrimento del fluido (nel nostro caso il sangue). Il $C\tau_0$ è aumentato negli emodializzati e correla con l'IAE e la ηS_1 , ma non la ηS_{200} (poiché ad alto ShR le cellule sono già disaggregate). La dialisi non influenza significativamente il parametro. Il dato è di estremo interesse perché mancano riferimenti in letteratura, ma soprattutto perché a parità di pressione arteriosa diastolica e di integrità dell'apparato valvolare cardiaco, un $C\tau_0$ elevato comporterà un aumento del post-carico e del lavoro cardiaco nella fase di contrazione isovolumetrica della sistole. Cronicamente, questo potrebbe contribuire allo sviluppo di ipertrofia del miocardio, anche nei pazienti con pressione arteriosa ben controllata.

Il Tk è risultato aumentato negli uremici prima della dialisi, mentre si corregge dopo dialisi. La ridotta DE degli uremici potrebbe contribuire alla progressione del danno d'organo anche quando la pressione arteriosa sistemica risulta ben controllata. In effetti a livello capillare, esaurito l'effetto Fahreus, il transito di un'emazia rigida comporta ipertensione capillare indipendentemente dai valori di PA sistemica ed esercita un aumento dello *shear stress* sull'endotelio con attivazione del medesimo e innesco dei processi che sottendono ad ipertrofia, iperplasia, rimodellamento vascolare e fibrosi.

Gli uremici presentano alterate proprietà viscoelastiche del sangue, migliorate sensibilmente dalla dialisi. Il miglioramento della deformabilità e del comportamento viscoelastico possono contribuire a mantenere una sufficiente perfusione del microcircolo al termine della seduta dialitica, condizione spesso caratterizzata da massima vasocostrizione, modica tachicardia e aumento della ηS secondarie alla rapida disidratazione intradialitica.

Le influenze emoreologiche dell'EPO sono controverse in letteratura (4, 9-11): da un lato sono segnalati effetti sfavorevoli (aumento ηS , ridotta DE e aumentata aggregabilità), dall'altro sono descritti effetti opposti che potrebbero contribuire, assieme alla correzione dell'anemia, alla riduzione del lavoro cardiaco. Purtroppo gli studi sono eterogenei e non standardizzati e quindi i dati non sono confrontabili. Va anche segnalata la necessità di considerare attentamente

l'inizio della terapia con EPO, perchè è probabile che nei primi 2 mesi i parametri emoreologici siano veramente peggiori, a causa dell'elevato numero di reticolociti (più rigidi delle emazie mature) che caratterizza la prima fase del trattamento. I nostri dati confermano effetti pro-reologici dell'EPO (riduzione della ηP , della ηS_{200} e probabile miglioramento della DE). La misurazione di questi parametri potrebbe aiutare ad identificare l'Ht ideale per ogni singolo paziente, tale per cui sia possibile trarre i massimi benefici dal farmaco sul lavoro cardiaco (in termini reologici e di correzione dell'anemia) ed evitarne gli effetti sfavorevoli (aumento del post-carico da eccessivo incremento dell'Ht e quindi della ηS).

La dialisi migliora la DE e tendenzialmente anche l'IAE. L'effetto sembra più spiccato con l'impiego di membrane sintetiche, che comportano minore attivazione leucocitaria, minore attivazione della cascata flogistica e minore stress ossidativo (12-13). Queste membrane sarebbero quindi da preferire nei pazienti ipertesi, diabetici, arteriopatici o comunque ad elevato rischio cardiovascolare.

L'iperparatiroidismo (5, 14-15) e l'aumento del calcio intraeritrocitario avrebbero un ruolo nel determinare la riduzione della DE negli uremici. Abbiamo in effetti osservato una riduzione della ηR nei soggetti con PTH < 120 pg/ml, ma il Tk non conferma il dato. Bisogna comunque considerare che, grazie alla terapia medica e/o chirurgica precoce, sono sempre più rare le forme di iperparatiroidismo severo: i dati della letteratura vanno quindi analizzati nel contesto clinico-temporale in cui sono stati raccolti.

Rimane infine il dubbio su quale sia il momento più appropriato per la misura dei parametri emoreologici negli uremici. Prima della seduta dialitica la ritenzione di tossine uremiche, l'acidosi e gli squilibri elettrolitici sono massimi (quindi massime sono le influenze negative dello stato uremico), tuttavia è massima anche l'emodiluizione, che condiziona una sottostima dei parametri misurati (almeno per la ηP e la ηS). Dopo la dialisi viene raggiunto il peso teorico ideale per il paziente, ma l'emoconcentrazione può essere eccessiva perché non è ancora completato il refilling dei acqua e soluti dall'interstizio e dalle cellule; la seduta dialitica comporta infine attivazione infiammatoria (più o meno importante a seconda della biocompatibilità del trattamento) e produzione di proteine della fase acuta (12-13). Per questi motivi le misure condotte al termine della dialisi possono sovrastimare il problema.

Conclusioni

I pazienti uremici presentano anomalie emoreologiche di cui la sola ηS_{200} viene compensata dall'anemia. Queste contribuiscono all'aumento del post-carico, al danno d'organo e alla ridotta perfusione del microcircolo anche quando la pressione arteriosa sistemica è ben controllata. Possono inoltre costituire un fattore predisponente per l'occlusione dell'accesso vascolare e lo sviluppo di acidosi in corso di bassa portata cardiaca.

Il trattamento con EPO e la correzione adeguata dell'anemia, mediante identificazione del valore Ht ideale, possono concorrere alla prevenzione dell'ipertrofia miocardica.

L'impiego di trattamenti depurativi con membrane sintetiche ad alta biocompatibilità sarebbero da preferire nei pazienti ad alto rischio cardiovascolare o con evidenze di danno d'organo.

Occorrono ulteriori studi per definire lo standard temporale clinicamente più proficuo per le misure emoreologiche nei pazienti uremici.

Bibliografia

1. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32:S112-9.
2. Marinez. Hemorheological alterations in patients with chronic renal failure. Effect of Hemodialysis. *Clin Hemorheol Microcirc* 1999; 21:1-6.
3. Kikuchi Y, Koyama T, Koyama Y, Tozawa S, Arai T, Horimoto M, Kakiuchi Y. Red blood cell deformability in renal failure. *Nephron* 1982; 30(1):8-14.
4. Nowak E, Wirwicz G, Dabrowski ZG, Smolenski O, Spodaryk K. Rheological properties of red blood cells (including reticulocytes) in patients with chronic renal disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 1999; 21:87-94.
5. Docci D, Del Vecchio C, Salvi P, Turci F, Salvi G, Cenciotti L, Pretolani E. Osmotic fragility of erythrocytes, cell deformability and secondary hyperparathyroidism in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Clin Nephrol* 1985; 23:68-73.
6. International Committee for Standardization in Hematology. Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol* 1986; 6:439-453.
7. Decamps Red cell filterability and chronic renal failure. *Scand J Clin Lab Invest* 1981; 41 (S):56.
8. Martorana MC, Mojoli G, Giuliani E, Mannella E. Ipotesi di costruzione di un modello matematico che definisca la dipendenza dall'ematocrito della viscosità e di eventuali altri parametri reologici. In: *Atti del 7° Convegno Nazionale di reologia*. Faenza, giugno 2001. Faenza e Ravenna: Gruppo Editoriale Faenza Editrice Spa; 2001. p. 137-9.
9. Shi YD, Artmann G, Agosti R, Longhini E. A modified Casson equation to characterize blood rheology for hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc* 1998;19(2): 115-127
10. Lerche D, Schmidt R, Zoellner K, Meier W, Paulitschke M, Distler B, Klinkmann H. Rheology in whole blood and in red blood cells under recombinant human erythropoietin therapy. *Contrib Nephrol* 1989; 76:299-303.
11. Zachee P, Ferrant A, Daelemans R, Coolen L, Goossens W, Lins RL, Couttenye M, De Broe ME, Boogaerts MA. Oxidative injury to erythrocytes, cell rigidity and splenic hemolysis in hemodialyzed patients before and during erythropoietin treatment. *Nephron* 1993;65(2):288-293.
12. Delamaire M, Durand F, Hamel D, Joyeux V, Lepogamp P, Genetet B. Amelioration des parametres hemorheologiques chez les patients hemodialyses traites par erythropoietine humaine recombinante. *J Mal Vasc* 1991;16(3):289-294.
13. Levine N, Ronco C. Chronic Inflammation: an overview. *Contrib Nephrol* 2002; 137:364-370.
14. Ronco C, Levin N. End stage renal disease: a slowly progressive systemic inflammatory response syndrome. *Contrib Nephrol* 2002; 137:379-385.
15. Bogin E, Earon Y, Blum M. Effect of parathyroid hormone and uremia on erythrocyte deformability. *Clin Chim Acta* 1986; 161(3):293-299.
16. Peuchant E, Salles C, Vallot C, Wone C, Jensen R. Increase of erythrocyte resistance to hemolysis and modification of membrane lipids induced by hemodialysis. *Clin Chim Acta* 1988; 178(3):271-282.

DANNI OSSIDATIVI E FUNZIONALI DURANTE L'INVECCHIAMENTO ERITROCITARIO

Patrizia Caprari (a), Anna Tarzia (a), Maria Cristina Martorana (b), Dario De Felicis (b)

(a) Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Croce Rossa Italiana, Centro Nazionale Trasfusione Sangue, Roma

Introduzione

I globuli rossi per trasfusione possono essere conservati, in condizioni standard (1), per un periodo limitato durante il quale vanno incontro ad una serie di cambiamenti biochimici e chimico-fisici, che possono influire sull'efficacia trasfusionale e determinare eventuali complicazioni legate ad essa (2, 3). Quando gli eritrociti conservati sono trasfusi ad un ricevente alcuni di essi rimangono in circolo con una vita mediamente normale mentre altri sono rimossi entro poche ore. Questo è dovuto a quella che viene definita la *storage lesion* di cui, ad oggi, ancora molto poco è conosciuto (4).

Nel processo di invecchiamento e di lisi degli eritrociti *in vivo* lo stress ossidativo svolge un ruolo fondamentale: essendo esposti ad alte pressioni di ossigeno, ricchi di lipidi poliinsaturi e in ferro, un potente catalizzatore per le reazioni dei radicali liberi, il globulo rosso si trova continuamente a contatto di radicali extra e intracellulari dai quali è in grado di proteggersi grazie ad una complessa architettura di membrana e alla presenza di sistemi enzimatici e sostanze *scavenger*. Se l'eritrocita non è in grado di contrastare adeguatamente l'aumentata produzione di radicali liberi va incontro a danni irreversibili che ne determinano l'invecchiamento con variazioni importanti a carico della permeabilità, dell'antigenicità e delle sue proprietà reologiche.

Il bersaglio principale degli insulti ossidativi è l'emoglobina che ossidata si lega irreversibilmente con le proteine della membrana determinando gravi alterazioni dell'organizzazione del membrano scheletro. Gli aspetti più importanti della denaturazione ossidativa della membrana sono le interazioni tra emoglobina ossidata e proteine del citoscheletro (5, 6), la formazione di emicromi irreversibili legati alla proteina banda 3 (7, 8), la perossidazione dei lipidi di membrana con riorganizzazione dei fosfolipidi (9). Tali eventi si associano a modificazioni morfologiche, ad una diminuzione di deformabilità dell'eritrocita e all'accumulo di marcatori associati alla membrana per il riconoscimento e la rimozione dal circolo (10).

Gli studi effettuati fino ad oggi su eritrociti conservati per la terapia trasfusionale sono stati rivolti a ricercare le condizioni migliori di conservazione attraverso l'aggiunta di opportuni additivi (adenina, glucosio, mannitolo) nelle soluzioni di mantenimento con la finalità di allungare i tempi di conservazione, aumentare il recupero delle cellule conservate e migliorarne la funzione. Sono state proposte, ad oggi, soluzioni di conservazione che, in base ai parametri di funzionalità eritrocitaria generalmente considerati (ATP, 2,3 DPG, potassio, indice di deviazione morfologica e la valutazione della percentuale di emolisi), potrebbero prolungare i tempi di conservazione anche fino a 10-11 settimane (11-12). Osservazioni sempre più frequenti (4, 13, 14), però, evidenziano la necessità di considerare ulteriori parametri che permettano una valutazione complessiva dello stato funzionale e vitale del globulo rosso (GR) reinfuso. Infatti, insieme alla capacità di trasportare e rilasciare l'O₂/CO₂, il GR conservato deve mantenere integre tutte le proprietà strutturali per evitare una diminuzione della sua deformabilità con

conseguente minore capacità di passare attraverso il microcircolo. Questo potrebbe determinare una riduzione del flusso ematico microvascolare, locale ipossia e potenzialmente un danno a livello dei vari organi (3, 15).

Lo scopo di questo lavoro era quello di valutare il danno ossidativo e funzionale delle emazie nei preparati per trasfusione durante i tempi di conservazione, considerando parametri nuovi indicativi di invecchiamento eritrocitario quali le capacità metaboliche e ossido-riduttive, le proprietà reologiche, lo stato strutturale delle proteine della membrana e la sensibilità ad un successivo stress ossidativo *in vivo*. Per quanto riguarda questo ultimo aspetto per simulare lo stress ossidativo *in vivo* gli eritrociti, conservati fino a 49 giorni, sono stati sottoposti a stress ossidativo *in vitro* utilizzando come agente ossidante il *tert*-butilidroperossido (t-BHP).

Metodi

Sono state prelevate 6 unità di sangue da donatori sani, allestite le relative preparazioni di emazie concentrate, secondo le procedure standard, e conservate in CPD/SAG-M per un periodo di 49 giorni a 4 °C presso la Croce Rossa Italiana, Centro Nazionale Trasfusione Sangue. Aliquote dei preparati di emazie sono state esaminate il giorno di preparazione della sacca (T₀) e nei tempi di 14, 21, 28, 35, 42 e 49 giorni. Per ogni aliquota sono state predisposte indagini per la valutazione dell'invecchiamento *in vitro* e della suscettibilità allo stress ossidativo *in vitro*.

Per valutare le capacità metaboliche e ossido-riduttive delle emazie conservate sono state esaminate le attività degli enzimi eritrocitari glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD), piruvato chinasi (PK) e glutatione reduttasi, secondo i metodi raccomandati dal Comitato Internazionale per la Standardizzazione in Ematologia (16) e il contenuto di glutatione ridotto (GSH) intraeritrocitario secondo il metodo di Beutler (17).

Per esaminare le proprietà reologiche delle emazie sono state effettuate misure della viscosità rotazionale, con Rotovisco RV20/CV 100 e sistema di misura ME 30 (HAAKE) in accordo con ICSH (18). Gli indici eritrocitari sono stati determinate con sistema ematologico Cell Dyn 3700 (Abbot).

Lo stato strutturale e funzionale delle proteine di membrana e del citoscheletro è stato valutato mediante elettroforesi denaturante in gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) dei ghosts e della spettina semipurificata (19). Le bande elettroforetiche sono state evidenziate con colorazione con Blue Coomassie e quindi valutate qualitativamente e quantitativamente mediante analizzatore d'immagini (Fluor-S™ MultiImager) con il software MultiAnalyst 1.1 (Bio-Rad Laboratories). L'identificazione di frammenti presenti negli estratti di spettina semipurificata è stata ottenuta mediante Western Blotting con anticorpo monoclonale anti-Spettrina e anti-Banda3.

Lo stress ossidativo è stato effettuato mediante incubazione di eritrociti isolati, sospesi in tampone fosfato (Hct 20%), con *tert*-butilidroperossido (t-BHP) 1,0 e 2,0 mM per 30 min a 37 °C (6). Dopo il trattamento con l'agente ossidante sui globuli rossi sono stati valutati gli stessi parametri metabolici, strutturali e reologici sopra indicati.

Risultati

L'invecchiamento degli eritrociti *in vitro* comporta una modulazione delle sue capacità riducenti. Infatti durante la conservazione il GSH intraeritrocitario mostra un decadimento, un parziale recupero a 14 e a 28 giorni di conservazione e una marcata diminuzione (25%) del

contenuto iniziale dopo 49 giorni (Figura 1). L'attività dell'enzima GR segue lo stesso andamento e in corrispondenza dei tempi in cui si osserva un parziale recupero del contenuto di GSH l'attività GR eritrocitaria risulta incrementata.

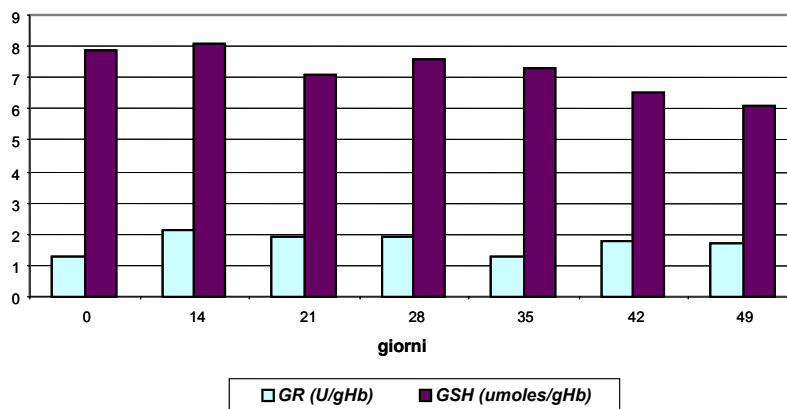


Figura 1. Variazioni dei livelli di GSH intraeritrocitario e dell'attività dell'enzima GR di emazie concentrate durante la conservazione in SAG-M fino a 49 giorni

L'induzione di uno stress ossidativo con *t*-BHP 1,0 mM (Figura 2) determina nei globuli rossi una drastica riduzione del GSH intraeritrocitario e induce un incremento dell'attività GR. Questo si osserva al t0, al 14° giorno e dopo il 42° giorno di conservazione. Tra il 21° e il 35° giorno il livello di GSH invece si riduce in modo meno marcato mantenendosi a circa il 50% del valore iniziale. A 42 giorni c'è una completa deplezione di GSH intraeritrocitario dopo stress ossidativo *in vitro*, nonostante l'incremento dell'attività GR.

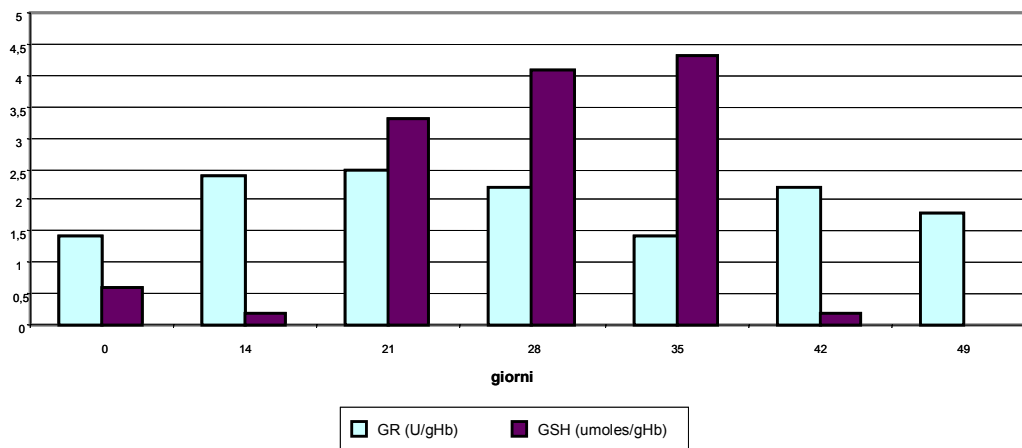


Figura 2. Variazioni dei livelli di GSH intraeritrocitario e dell'attività dell'enzima GR dopo stress ossidativo *in vitro* di eritrociti conservati in SAG-M fino a 49 giorni

Una riduzione delle attività degli enzimi G6PD e PK viene osservata durante tutto il periodo di conservazione; lo stress ossidativo *in vitro* induce l'attivazione dell'enzima PK tale per cui al 35° giorno raggiunge il suo massimo (Figura 3)

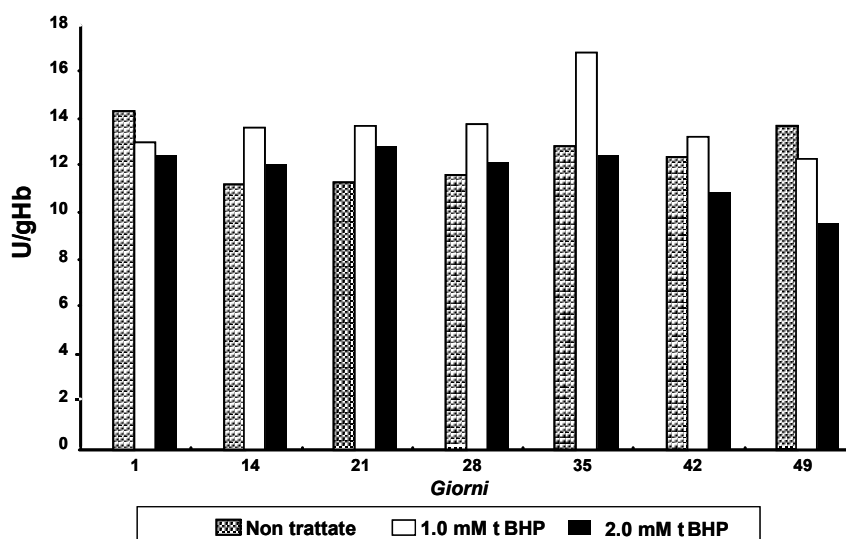


Figura 3. Variazioni dell'attività dell'enzima PK di eritrociti conservati in SAG-M durante la conservazione e dopo stress ossidativo *in vitro*

L'esame degli indici eritrocitari durante la conservazione fino a 49 giorni, mostra un incremento del volume medio corpuscolare (*Mean Corpuscular Volume*, MCV) degli eritrociti di circa il 10% rispetto al valore iniziale, mentre la concentrazione emoglobinica corpuscolare media (*Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC) tende ad aumentare fino al 35° giorno per poi diminuire sensibilmente. Corrispondentemente si osservano alterazioni reologiche con aumento dei valori di viscosità (Figura 4); dopo trattamento con *t*-BHP 1,0 mM la curva di viscosità mostra lo stesso andamento ma con valori più bassi, mentre con uno stress maggiore con *t*-BHP 2,0 mM i valori di viscosità si abbassano drasticamente suggerendo la presenza di un danno all'integrità della membrana e la distruzione di molte cellule. Le variazioni nei valori di MCV potrebbero in parte giustificare i cambiamenti di viscosità osservati sia nelle emazie trattate sia in quelle non trattate (Figura 4).

Per verificare la presenza di anomalie strutturali sono state studiate le proteine della membrana eritrocitaria con e senza stress ossidativo. L'analisi dei quadri elettroforetici delle proteine di membrana delle emazie conservate rivela una progressiva denaturazione della spettina e della proteina Banda 3 e un marcato aumento di prodotti ad alto peso molecolare (*High Molecular Weight Product*, HMWP) (Figura 5).

L'analisi degli estratti di spettina semipurificata mostra una denaturazione ossidativa soprattutto a carico della spettina che diventa nel tempo meno estraibile. Si osserva inoltre la formazione di prodotti di *cross-linking* ad alto peso molecolare e di prodotti di degradazione a basso peso molecolare (*Low Molecular Weight Product*, LMWP). La presenza di frammenti fra i 200 e 140 kDa che legano l'anticorpo monoclonale anti-spettrina conferma un danno ossidativo a carico del membrano-scheletro. Prodotti di frammentazione della proteina Banda 3 vengono coestratti con la spettina, dimostrando un danno ossidativo anche nella principale integrale proteina di membrana.

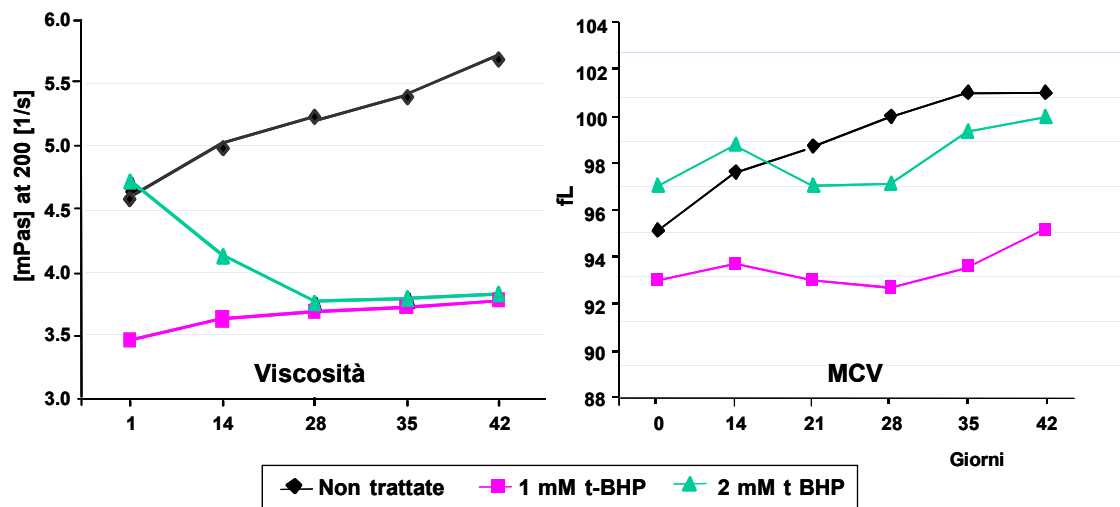


Figura 4. Modificazioni reologiche di eritrociti conservati in SAG-M durante la conservazione e dopo stress ossidativo *in vitro*

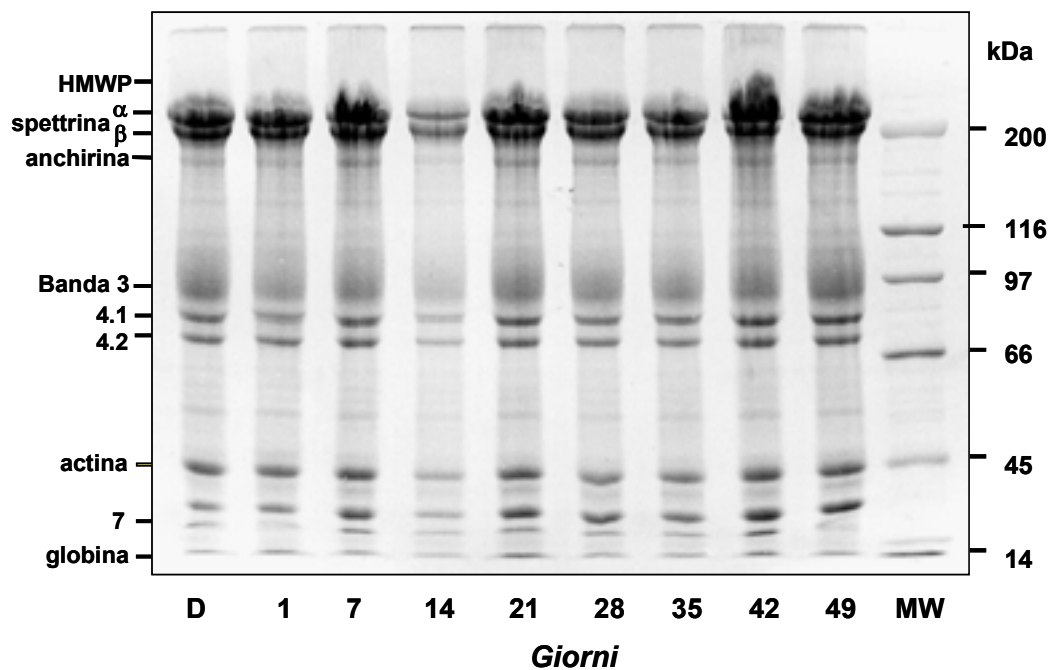


Figura 5. Pattern elettroforetici (SDS-PAGE) delle proteine di membrana di eritrociti conservati in SAG-M per 49 giorni

Lo stress ossidativo *in vitro* su eritrociti conservati altera in modo evidente l'organizzazione del membrano scheletro. Infatti dopo trattamento con *t*-BHP è evidente una marcata diminuzione della spettina e della proteina banda3 contemporaneamente ad un incremento della

formazione di HMWP (Figura 6). L'entità di tali modificazioni è strettamente correlato alla concentrazione di *t*-BHP e allo stato ossido-riduttivo della cellula. Infatti tra il 21° e il 35° giorno, quando cioè i livelli di GSH risultano più elevati, si osservano danni minori a carico delle principali componenti proteiche della membrana. Dopo il 35° giorno la denaturazione ossidativa delle proteine di membrana è estremamente marcata, soprattutto a carico della spettrina.

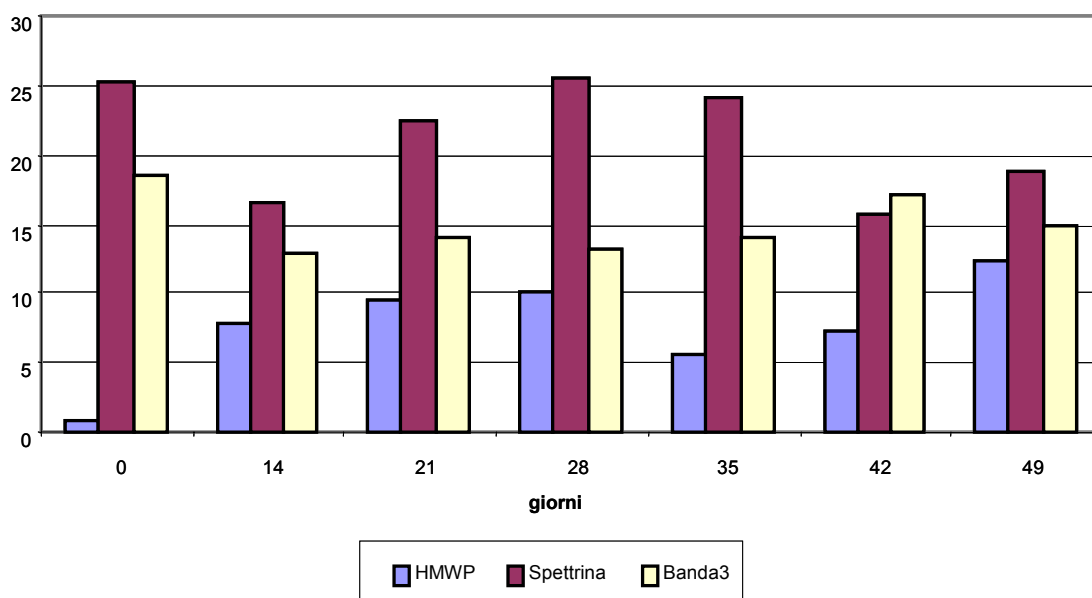


Figura 6. Valori percentuali delle proteine di membrana di emazie concentrate dopo stress ossidativo *in vitro* durante la conservazione

Pertanto alle alterazioni reologiche osservate durante la conservazione e dopo stress ossidativo *in vitro* corrispondono alterazioni sia nelle componenti della membrana che delle loro interazioni.

Conclusioni

Diversi studi hanno dimostrato che, nonostante l'uso di diverse soluzioni preservanti, la conservazione delle emazie risulta in una serie di alterazioni che conducono ad un grave danno delle cellule con conseguenze quali la ridotta funzionalità dell'eritrocita e la diminuita sopravvivenza post-trasfusionale. Le attuali conoscenze indicano come principale responsabile del danno lo stato fisico della membrana e quindi del sottostante membrano-scheletro. Il mantenimento della loro struttura e della loro funzione sono fondamentali per l'integrità e la deformabilità del globulo rosso, e quindi per una regolare circolazione post-trasfusionale. La natura delle alterazioni della membrana sono probabilmente in stretta correlazione con lo stato metabolico della cellula. Durante il periodo di conservazione dei preparati di emazie, si osservano cambiamenti nelle proprietà biochimiche, chimico-fisiche e reologiche delle emazie. Fra questi alcuni sembrano essere reversibili altri invece irreversibili. I primi sono

principalmente a carico del metabolismo e delle capacità ossido-riducenti delle cellule e mostrano un indebolimento consistente a partire dalla quinta settimana. La denaturazione ossidativa delle proteine di membrana e le modificazioni delle proprietà reologiche appaiono progressivamente durante tutto il periodo di conservazione e sembrano essere irreversibili.

Inoltre le emazie conservate sembrano essere particolarmente sensibili allo stress ossidativo. Le capacità metaboliche e ossido-riduttive degli eritrociti conservati rispondono all'insulto ossidativo in modo diverso tempo-dipendente e la perdita della difesa anti-ossidante sembra essere strettamente collegata alla denaturazione delle proteine di membrana e del membrano-scheletro. L'indebolimento dei sistemi antiossidanti intracellulari, l'aumentata suscettibilità allo stress ossidativo e la denaturazione delle proteine di membrana potrebbe essere la serie di eventi che intercorrono fra l'invecchiamento eritrocitario e l'evento emolitico.

Bibliografia

1. Council of Europe Committee of Ministers. *Recommendation No. R (95) 15 of the Committee of Ministers to Members States on the preparation, use and quality assurance of blood components*. Strasbourg: Council of Europe publishing; 1997.
2. Wolfe LC. The membrane and lesion of storage in preserved red cells. *Transfusion* 1985; 25:185-202.
3. Friedlander MH, Simon R, Machiedo GW. The relationship of cell transfusion to the red blood cell deformability in systemic inflammatory response syndrome patients. *Shock* 1998; 9:84-88.
4. Tinmouth A, Chin-Yee I. The clinical consequences of the red cell storage lesion *Trans Med Rev* 2001; 15:91-107.
5. Keifer CR, Trainor JF, McKenney, JB, Valeri CR, Snyder LM. Hemoglobin-spectrin complexes: interference with spectrin tetramer assembly as a mechanism for compartmentalization of band 1 and band 2 complexes. *Blood* 1995; 86:366-371.
6. Caprari P, Bozzi A, Malorni W, Bottini A, Iosi F, Santini MT, Salvati AM. Junctional sites of erythrocytes skeletal proteins are specific targets of ter-butylhydroperoxide oxidative damage. *Chem Biol Interact* 1995; 94:243-258.
7. Ando K., Beppu M., Kikugawa K., Hamasaki N. Increased susceptibility of stored erythrocytes to anti-band 3 IgG autoantibody binding. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1178:127-134.
8. Mannu F, Arese P, Cappellini MD, Fiorelli G, Cappadoro M, Giribaldi G, Turrini F. Role of hemicrome binding to erythrocyte membrane in the generation of Band3 alterations in β -thalassaemia intermedia erythrocytes. *Blood* 1995; 86:2014-2020.
9. de Jong J, Beleznyay Z, Ott P. Phospholipid asymmetry in red blood cells and spectrin-free vesicles during prolonged storage. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1281:101-110.
10. Kuypers FA, Yuan J, Lewis RA, Snyder LM, Keifer CR, Bunyaratvej A. Membrane phospholipid asymmetry in human thalassaemia. *Blood* 1998; 91:3044-3051.
11. Hess JR, Rugg N, Knapp AD. Successful storage of RBCs for 10 weeks in a new additive solution. *Transfusion* 2000; 40:1012-1016.
12. Hess JR, Rugg N, Gormas JK, Knapp AD, Hill HR, Oliver CK, Silberstein EB, Greenwalt TJ. RBC storage for 11 weeks. *Transfusion* 2001; 41:1586-1590.
13. Dumaswala UJ, Zhuo L, Jacobsen DW, Jain SK. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:1041-1049.
14. Dumaswala UJ, Dumaswala DS, Levin DS, Greenwalt TJ. Improved red blood cell preservation correlates with decreased loss of band3, 4.1, acetylcholinesterase, and lipids in microvesicles. *Blood* 1996; 4:1612-1616.

15. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, Deitch EA, Machiedo GW Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res* 2002; 102:6-12.
16. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, Lohr GW, Ramot B, Valentine WN. International Committee for Standardization in Hematology: Recommended Methods for Red Cell Enzyme Analysis. *Br J Haematol* 1977; 35:331-339.
17. Beutler E. Reduced glutathione (GSH). In: Beutler E (Ed). *Red cell metabolism*. New York: Grune&Stratton; 1971. p. 96-99.
18. International Committee for Standardization in Hematology. Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol* 1986; 6:439-453.
19. Caprari P, Bozzi A, Ferroni L, Giuliani A, Furciniti La Chiusa B, Strom R, Salvati AM. Membrane alterations in G6PD- and PK-deficient erythrocytes exposed to oxidizing agents. *Biochem Med Metabol Biol* 1991; 45:16-27.

DEFORMABILITÀ E CONSERVAZIONE DEI GLOBULI ROSSI

Roberto Reverberi (a), Maurizio Govoni (b)

(a) Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale, Arcispedale S. Anna, Ferrara

(b) Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale, Ospedale Maggiore, Bologna

Durante la conservazione *in vitro* dei globuli rossi si verificano numerosi cambiamenti biochimici e morfo-strutturali. La correlazione fra questi cambiamenti e la vitalità (sopravvivenza e recupero *in vivo*) è stata oggetto di numerosi studi. Gli scopi erano:

- chiarire per quali meccanismi i globuli rossi perdono progressivamente la loro vitalità;
- individuare una metodica per predire la vitalità;
- offrire un modo con cui valutare *in vitro* l'efficacia di metodiche alternative di conservazione.

La concentrazione di ATP è il parametro meglio correlato con la vitalità, anche se la relazione non è lineare (1). Certamente, tuttavia, altri fattori sono pure importanti poiché se si corregge il difetto biochimico ("ringiovanimento") la relazione con la concentrazione di ATP sparisce mentre diventa significativa quella con la morfologia (2). Al contrario del difetto biochimico, i cambiamenti morfologici sono solo parzialmente reversibili (2).

Un fenomeno che induce un cambiamento morfologico irreversibile è la microvescicolazione (3). I globuli rossi metabolicamente depleti perdono vescicole prive di spettrina (4) contenenti piccole quantità di emoglobina e il risultato finale è una diminuzione del rapporto superficie/volume e quindi una minore deformabilità. L'importanza di quest'ultimo parametro è illustrato dal caso di un donatore di sangue i cui globuli rossi mostravano una perdita di vitalità accelerata durante la conservazione (5). I parametri biochimici e morfologici apparivano normali ma la deformabilità peggiorava molto più rapidamente nel tempo che negli altri campioni (5). Un'ipotesi attraente per legare tutti questi dati è che la concentrazione di ATP condizioni la velocità con cui il globulo rosso recupera *in vivo* le modifiche reversibili della morfologia e della deformabilità: se la velocità è insufficiente, il globulo rosso rimane intrappolato nel circolo splenico e viene rimosso (2). La vescicolazione sarebbe invece responsabile dei cambiamenti irreversibili.

Per mettere alla prova questa ipotesi, abbiamo studiato una serie di parametri fra i quali la concentrazione di ATP, la deformabilità, la vescicolazione, la morfologia e l'emolisi durante la conservazione in condizioni note per la diversa efficacia nel mantenere la vitalità (6).

Condizioni di conservazione

Abbiamo studiato 5 differenti soluzioni di conservazione, 2 delle quali adatte per conservare sangue intero (CPD e CPDA) e 3 per conservare globuli rossi concentrati (ADSOL, PAGGS, SAGM). In ogni esperimento, sangue dello stesso volontario era diviso in 5 aliquote (100 ml ciascuna) in modo da evitare che i risultati fossero influenzati dalle differenze fra i soggetti. In totale abbiamo studiato 5 volontari. Le misurazioni erano effettuate settimanalmente per 8 settimane.

Misurazione della deformabilità

Abbiamo scelto la tecnica della filtrabilità, modificata da noi (7). Questa metodica è sensibile a variazioni del rapporto superficie/volume e della viscosità citoplasmatica, e cioè a quei fattori determinanti la deformabilità che dovrebbero modificarsi durante la conservazione (8). Noi abbiamo verificato che la nostra tecnica è sensibile sia ad un generale modesto aumento di rigidità, sia alla presenza di una piccola (5%) popolazione di cellule rigide (7). I globuli rossi erano lavati e sospesi in una soluzione isotonica (300 mOsm) contenente tampone fosfato a pH 7,4, albumina (per evitare la formazione di echinociti) e glucosio. I globuli bianchi erano rimossi per filtrazione su cotone. La determinazione consisteva nel misurare il tempo di passaggio di 10 ml di sospensione a 30.000 GR/ μ l a 37 °C attraverso una membrana microporosa con pori di circa 3 μ m di diametro.

Misurazione della vescicolazione

Le microvescicole contengono l'acetilcolinesterasi di membrana. Noi abbiamo pertanto misurato l'attività acetilcolinesterasica nel sovrantante dopo aver inibito con chinidina solfato la colinesterasi plasmatica (9).

Morfologia

La morfologia è stata studiata dopo fissazione in glutaraldeide al 2%. Almeno 200 cellule erano classificate in rapporto al grado di deviazione dalla forma discocitaria (2). In presenza di soli discociti lo score era 100. In presenza di soli sferociti lo score era 0.

Modificazioni dei parametri durante la conservazione

La concentrazione di ATP (Figura 1) ha mostrato le modificazioni attese. Il CPD, l'unica soluzione senza adenina, era chiaramente il peggiore. Il PAGGS è stato per converso il migliore e ha mantenuto l'ATP per 3-4 settimane ai livelli di partenza. Il PAGGS contiene guanosina oltre che adenina e si differenzia inoltre per una osmolarità inferiore.

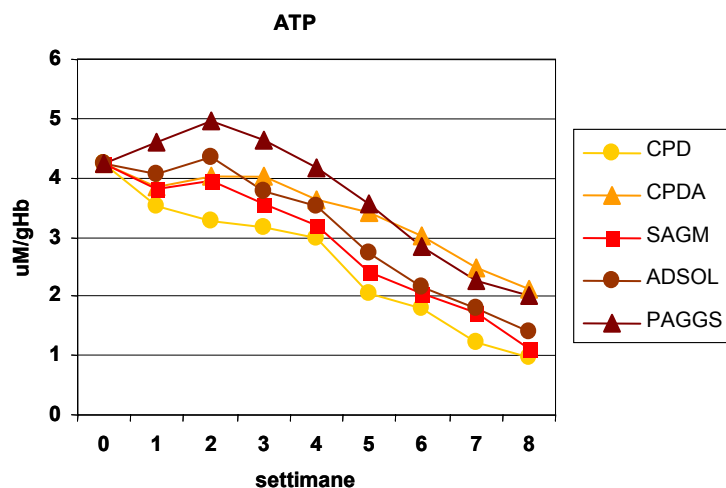


Figura 1. Concentrazione di ATP (μ M/gHb) durante la conservazione in 5 differenti soluzioni

La filtrabilità mostrava un andamento molto simile all'ATP (speculare a causa del tipo di determinazione), con le 5 soluzioni di conservazione classificate nello stesso ordine (Figura 2). È interessante inoltre notare come ai valori elevati di ATP nelle prime settimane in PAGGS corrispondesse un plateau della filtrabilità.

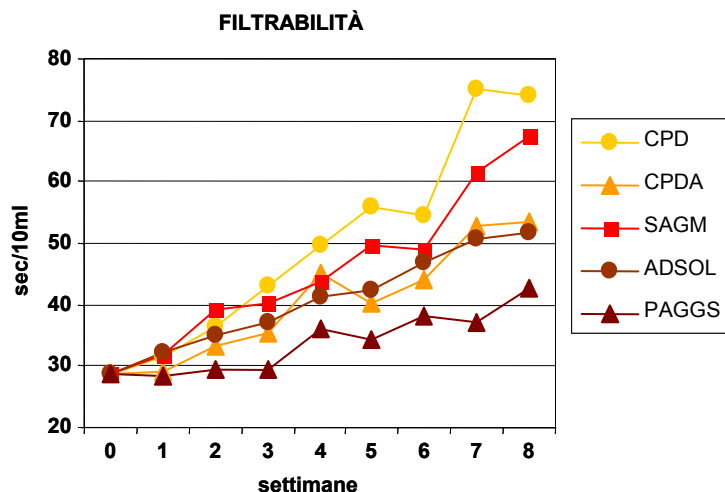


Figura 2. Filtrabilità durante la conservazione. Il tempo di filtrazione (asse Y) è inversamente proporzionale alla filtrabilità (deformabilità)

L'andamento dell'attività colinesterasica nel plasma era invece chiaramente differente (Figura 3). La curva era esponenziale e nelle prime 3-5 settimane le modificazioni erano minime. Il fatto che a 3 settimane, e cioè al limite di conservabilità del CPD, tutte le soluzioni diano risultati sovrapponibili, indica che la vescicolazione non può essere il responsabile principale della diminuzione di vitalità in questo periodo.

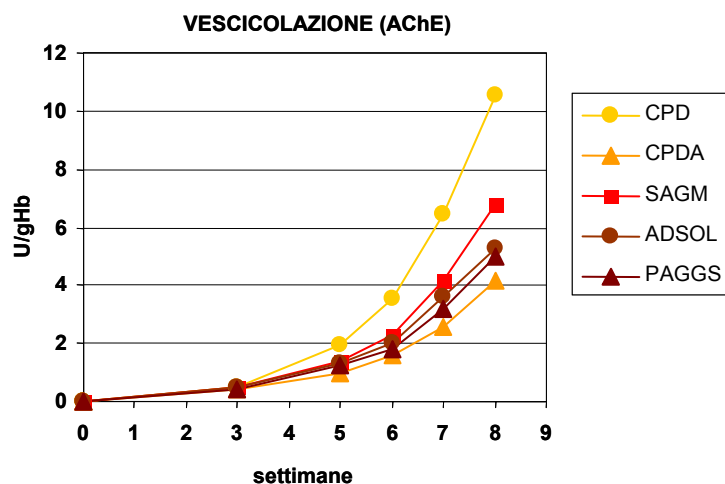


Figura 3. Attività acetilcolinesterasica nel sovrinatante (vescicolazione) durante la conservazione

Per quanto concerne la morfologia (Figura 4), nelle prime 5 settimane di conservazione solo il PAGGS si differenzia in maniera netta (in meglio) dalle altre soluzioni. Anche per la morfologia, valgono le considerazioni fatte per il rapporto fra vescicolazione e vitalità.

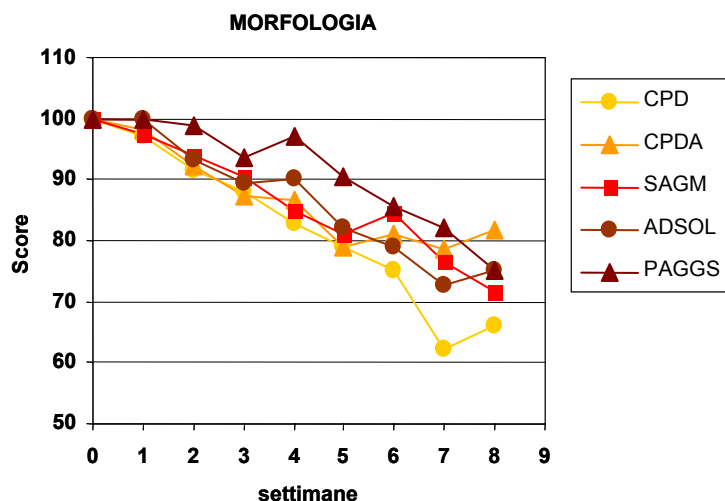


Figura 4. Andamento della morfologia eritrocitaria durante la conservazione (correlazione fra ATP, vescicolazione e deformabilità)

ATP, vescicolazione e deformabilità sono tutte variabili tempo-dipendenti e pertanto possono apparire correlate fra di loro anche solo per questa caratteristica in comune. Per eliminare l'influenza del tempo è necessario esaminare la relazione fra le variabili separatamente per ogni settimana di conservazione. La Tabella 1 riporta questi dati e fornisce alcuni spunti interessanti.

Tabella 1. Coefficienti di correlazione semplice fra deformabilità, ATP e vescicolazione

Settimana	Deformabilità/ATP	Deformabilità/Vescicolazione
1	0,56	-
2	0,64	-
3	0,56	0,29
4	0,67	-
5	0,81	0,47
6	0,81	0,72
7	0,65	0,81
8	0,60	0,71

La correlazione fra deformabilità e ATP è elevata e statisticamente significativa sin dalla prima settimana di conservazione e si mantiene tale per tutto il periodo di osservazione.

La Figura 5 mostra il diagramma di dispersione dopo 3 settimane (scadenza del CPD) e dopo 6 settimane (scadenza di ADSOL, PAGGS e SAGM).

Al contrario, la correlazione fra deformabilità e vescicolazione raggiunge valori elevati solo dalla sesta settimana (Tabella 1 e Figura 6).

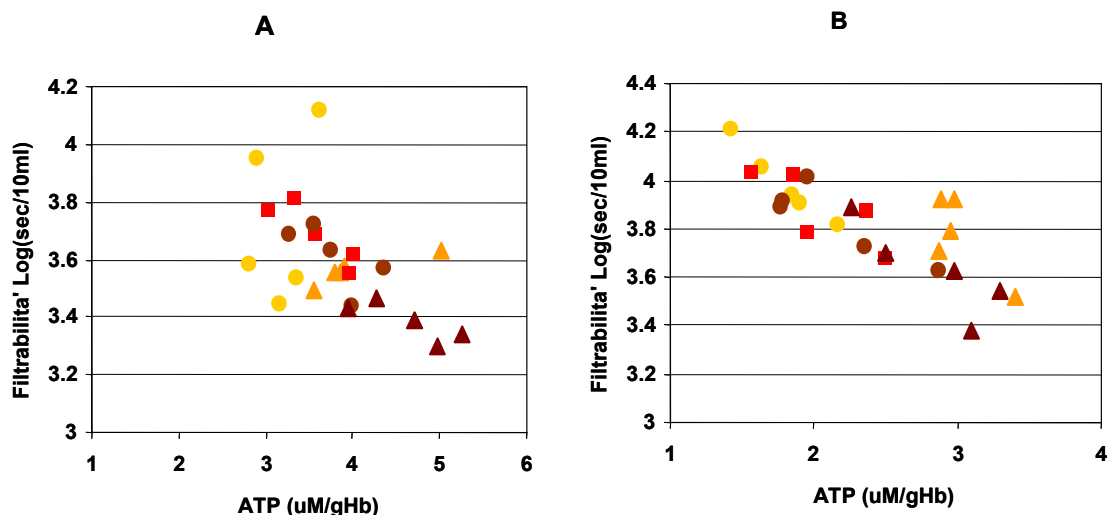


Figura 5. Diagramma di dispersione ATP/ Deformabilità dopo 3 settimane di conservazione (panelA) e dopo 6 settimane (panel B) (i simboli sono gli stessi delle figure precedenti)

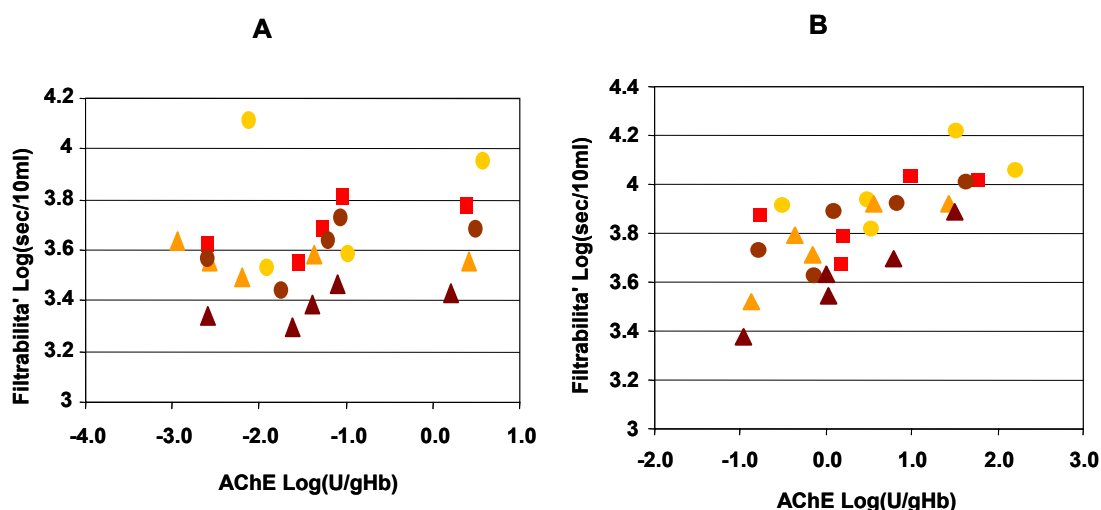


Figura 6. Diagramma di dispersione Vescicolazione/Deformabilità dopo 3 settimane di conservazione (panel A) e dopo 6 settimane (panel B) (AChE: attività acetilcolinesterasica)

Questo è ulteriormente confermato sottraendo l'influenza dell'ATP, e cioè usando l'ATP come variabile di controllo nel calcolo della correlazione parziale fra deformabilità e vescicolazione (Tabella 2): i dati mostrano che la vescicolazione spiega una parte rilevante della varianza della deformabilità solo a partire dalla sesta settimana di conservazione.

In conclusione, la deformabilità varia significativamente durante la conservazione in relazione alla soluzione conservante. Le variazioni corrispondono alle differenze attese nella vitalità. ATP e deformabilità sembrano ben correlati e pertanto i nostri risultati suggeriscono che la deformabilità può essere il meccanismo con il quale la deplezione metabolica influenza la vitalità.

Tabella 2. Coefficienti di correlazione fra deformabilità e vescicolazione (ATP usata come variabile di controllo)

Settimana	Deformabilità/Vescicolazione
3	0,11
5	0,24
6	0,57
7	0,70
8	0,65

In qual modo poi la deplezione metabolica possa diminuire la deformabilità non è noto. Certamente tuttavia la vescicolazione non può giocare un ruolo significativo poiché si tratta di un fenomeno rilevante solo dopo molte settimane di conservazione.

Bibliografia

1. Dern RJ, Brewer GJ, Wiorkovski JJ. Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other *in vitro* measures to red cell storage ability. *J Lab Clin Med* 1967; 69:968-978.
2. Högman CF, de Verdier CH, Ericson A, Hedlund K, Sandhagen B. Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4 °C *in vitro*. I. Cell shape and total adenylate concentration as determinant factors for posttransfusion survival. *Vox Sang* 1985; 48:257-268.
3. Rumsby MG, Trotter J, Allan D, Michell RH. Recovery of membrane microvesicles from human erythrocytes stored for transfusion: A mechanism for the erythrocyte discocyte-to-spherocyte shape transformation. *Biochem Soc Trans* 1977; 5:126-128.
4. Lutz HU, Liu Sc, Palek J. Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. I. Characterization of spectrin-free vesicles. *J Cell Biol* 1977; 73:548-560.
5. Card RT, Mohandas N, Mollison PL. Relationship of post-transfusion viability to deformability of stored red cells. *Br J Haematol* 1983; 53:237-240.
6. Reverberi R, Govoni M, Menini C. Filterability, vesiculation and ATP concentration during red blood cell storage *in vitro*. *La Trasfusione del Sangue* 1991; 36:587-592.
7. Reverberi R, Govoni M, Menini C. Measuring erithrocyte filterability: factors influencing sensitivity and reproducibility. *La Trasfusione del Sangue* 1991; 36:582-586.
8. Wolfe LC. The membrane and the lesions of storage in preserved red cells. *Transfusion* 1985; 25:185-203.
9. Whittaker M. *Cholinesterases*. In: Bergmayer HU, Bergmayer J, Grassl M (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, 3rd edition. Weinheim: VCH; 1985. IV, p. 57-63.

IPOTESI DI COSTRUZIONE DI VALORI DI RIFERIMENTO IN EMOREOLOGIA INDIPENDENTI DALL'EMATOCRITO PARTENDO DA UN MODELLO MATEMATICO

Maria Cristina Martorana (a), Giorgio Mojoli (b), Emilio Mannella (a)
(a) *Croce Rossa Italiana, Centro Nazionale Trasfusione Sangue, Roma*
(b) *Libero professionista consulente, Miane (TV)*

Indispensabile premessa a qualsiasi tipo di analisi che si effettua è il valore di riferimento e come questo è stato calcolato. Questo lavoro è stato approntato per costruire un modello matematico che permettesse di arrivare ad una correzione dei valori delle variabili reologiche, scevri dall'influsso dell'ematocrito, seguendo le norme internazionali di riferimento in reologia (1, 2).

Un fattore importante della fisiologia eritrocitaria è l'ematocrito (Hct), che rappresenta la percentuale del volume ematico occupata dagli elementi corpuscolati (cellule). Esso è considerato un indice della concentrazione dei globuli rossi e, conseguentemente, una misura indiretta della capacità di trasporto di ossigeno del sangue. In un adulto fisiologicamente sano l'Hct è compreso fra 38% e 45%, ciò significa che 38-45% del sangue intero è costituito da globuli rossi. Le altre cellule presenti (globuli bianchi e piastrine) in genere costituiscono solo l'1% dell'Hct. Il restante 55% è rappresentato dal plasma.

Il sangue è un liquido non newtoniano, dove la viscosità varia in funzione del suo gradiente di velocità o *shear rate* (D). La viscosità ematica, e le altre variabili reologiche che ne definiscono il comportamento, sono dipendenti dalle condizioni fisiologiche, estremamente soggettive, in cui il fluido viene a trovarsi. Ad un aumento lineare dell'Hct, compreso fra 0,20 e 0,70, si contrappone un incremento di tipo non lineare della viscosità e dei parametri viscoelastici. Le indagini reologiche devono essere, come tutte le analisi, riproducibili e ripetibili, da effettuare in assenza di eventi perturbanti, che per questo tipo di analisi vanno dal prelievo al lavaggio o alla concentrazione per centrifugazione.

Analizzando i dati reperibili in letteratura (3-6), si sono potute constatare notevoli discrepanze fra gli intervalli di riferimento della viscosità, calcolati su soggetti clinicamente sani. Le discrepanze erano varie, sia di ordine metodologico che strumentale: temperature varie a cui sono state effettuate le misure, viscosimetri molto differenti fra loro, anticoagulanti diversi usati per il prelievo, nessuna differenza di divisione fra i dati di popolazione maschile, femminile e per età.

In emoreologia, molto spesso una seppur minima variazione nella viscosità ematica, plasmatica o serica può essere significativa dal punto di vista clinico. È, inoltre, noto che il sangue di soggetti dediti al fumo è normalmente più viscoso dei non fumatori poiché, in genere, si riscontrano livelli più elevati di fibrinogeno e maggior rigidità della membrana eritrocitaria.

Materiali e metodi

Popolazione

Il presente studio ha interessato, nella prima fase, n. 12 adulti sani di entrambi i sessi, non fumatori, in età compresa fra 30 e 45 anni, cui è stata prelevata una adeguata quantità di sangue tale da consentire le analisi a diverse concentrazioni globulari (da un Hct di 35% ad un Hct del

70%) della viscosità ematica in condizioni di moto rotazionale continuo e delle componenti viscoelastiche, in moto oscillatorio mediante test di dipendenza della deformazione e della velocità di deformazione (*strain e frequency sweep*).

Nella seconda fase, sono stati scelti n. 115 donatori, apparentemente sani e non sottoposti a terapie di alcun genere, che sono stati divisi per fasce di età e sesso: donne e uomini fra 18-30, 31-35, 36-40, 41-45, 46-50, 54 anni.

I prelievi sono stati effettuati dalla stessa persona, mediante la stessa modalità operativa, al fine di limitare lo stress legato al prelievo. I campioni sono stati mantenuti in ambiente termoregolato per tutto il tempo necessario all'esecuzione delle misure, le quali sono state eseguite nel minor tempo possibile.

L'influenza della geometria cellulare e della viscosità interna sull'aggregazione eritrocitaria e le diverse forme di viscosità possono essere corrette con l'Hct, in modo da eliminare la componente numerica eritrocitaria. A questo scopo, si sono stabiliti due limiti teorici: un limite inferiore corrispondente al valore zero di viscosità corpuscolare (si è utilizzata la viscosità del plasma omologo di ognuno poiché esso è considerato un liquido newtoniano in cui la viscosità varia in modo scarsamente apprezzabile in funzione della *shear rate*), e un limite superiore in cui tutta la viscosità ematica è rappresentata dalla componente viscosa corpuscolare es Hct 70%, con definizione di una scala di valori percentuali compresi fra zero e 70.

Per ogni campione di sangue intero, prelevato con anticoagulante EDTA-K₃, sono state effettuate 48 misure reologiche, analizzando il sangue in concentrazioni crescenti e decrescenti di ematocriti in funzione della viscosità plasmatica ed ematica (Diluizioni 5 Hct: 35, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 55, 60, 65, 70, oltre ovviamente Hct nativo).

Valutazione numerica e statistica

I dati numerici ricavati sono stati valutati numericamente mediante medie aritmetiche e deviazioni standard.

I due gruppi sono stati divisi in due categorie:

- 12 donatori non fumatori utilizzati per lo sviluppo del modello matematico di correlazione viscosità/ ematocrito;
- 115 donatori utilizzati per la determinazione dei valori di riferimento.

Strumentazione

Le misure sono state eseguite con un viscosimetro rotazionale, con sistema "Couette" RV-20 con testata di misura CV-100 e sistema a cilindri coassiali ME 31 interfacciato a calcolatore IBM compatibile 386 con Rheocontroller RC20, in moto rotazionale continuo a 200 s⁻¹ e ad 1 s⁻¹. La temperatura di lavoro era di 37 °C ± 0,01:

$$\eta_1 = \eta_{PL} + K_{1Corr} * (HCT)^2 * \sqrt{HCT}$$

$$\frac{\eta_1 - \eta_{PL}}{(HCT)^2 * \sqrt{HCT}} = K_{1Corr}$$

$$\eta_{200} = \eta_{PL} + K_{200Corr} * (HCT)^2 * \sqrt{HCT}$$

$$\frac{\eta_{200} - \eta_{PL}}{(HCT)^2 * \sqrt{HCT}} = K_{200Corr}$$

dove: $\eta_1 = \text{Eta} (1 \text{ s}^{-1})$

$\eta_{200} = \text{Eta} (200 \text{ s}^{-1})$

$\eta_{PL} = \text{EtaPlasma}$

$HCT = \text{Ematocrito}$

Risultati e discussione

I risultati che si presentano (Tabella 1, Figura 1) sono quelli relativi al moto rotazionale continuo, dove le medie finali elaborate vengono utilizzate come valori raccomandati di riferimento del nostro laboratorio. La deviazione standard si è utilizzata per la valutazione dei limiti di accettabilità.

Tabella 1. Valori di ematocrito (Hct) e di viscosità in 115 donatori (maschi n=63 e femmine n.= 52)

Donatori	Età (anni)	Hct (%)	η_{200} (1/s) (mPa)	η_1 (1/s) (mPa)	$\eta_{PI 200}$ (1/s) (mPa)
Maschi					
	18-30	43,6	3,8	14,7	1,3
	31-35	45,9	4,3	18,7	1,3
	36-40	44,8	3,9	16,1	1,3
	41-45	45,2	4,6	20,4	1,4
	46-50	45,3	4,3	18,6	1,3
	54	46,9	3,7	16,6	1,3
media		45,3	4,1	17,5	1,3
DS		1,09	0,35	2,05	0,03
Femmine					
	18-30	38,1	3,5	12,2	1,3
	31-35	40,0	3,2	12,6	1,3
	36-40	40,0	3,5	14,3	1,3
	41-45	39,2	3,5	13,4	1,3
	46-50	40,9	3,6	15,6	1,4
media		39,6	3,5	13,6	1,3
DS		1,05	0,14	1,36	0,04

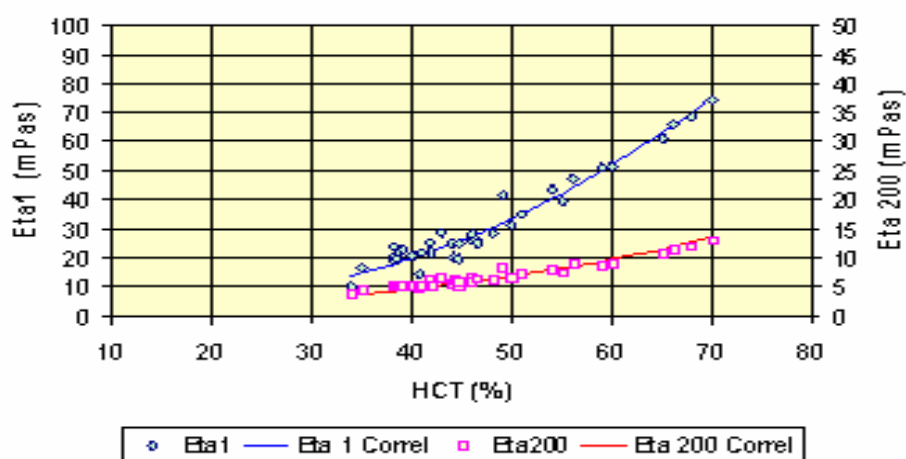


Figura 1. Valutazione del modello matematico (valori sperimentali e valori correlati)

L'elaborazione del modello di correlazione tra viscosità ed ematocrito permette la correzione di dati sperimentali in presenza di pazienti con basso ematocrito, eliminando manipolazioni dannose.

È in fase di studio la possibilità di poter correlare i dati relativi al comportamento viscoelastico del sangue mediante lo stesso modello, ciò permetterebbe di ottenere un metodo per la valutazione del suo comportamento reologico complessivo, utilizzando dei parametri di correlazione attendibili e sicuramente riferiti a misure ottenute da individui sani.

Ringraziamenti

Si ringraziano Antenucci Marco, Cittadini Paolo, Di Pietro Giancarlo, Giovannoni Paolo, Iacoboni Letizia, Lavorino Claudio, Lo Pinto Franca, Miccio Andrea, Pelo Manuela, Sabani Margherita, Sciarpettetti Anna Maria, Zampetti Sabrina.

Bibliografia

1. Stuart J. Erythrocyte rheology. *J Clin Pathol* 1985; 38:965-77.
2. International Committee for Standardization in Haematology Guidelines on selection of laboratory tests for monitoring the acute phase response *J Clin Pathol* 1988; 41:1203-12.
3. Harkness J. Measurement of plasma viscosity In: *Clinical aspects of blood viscosity and cell deformability*. Berlin: Springer-Verlag; 1981. p. 80-91.
4. Dintenfass L, Kammer S. Plasma viscosity in 615 subjects. Effect of fibrinogen, globulin, and cholesterol in normals, peripheral vascular disease, retinopathy, and melanoma. *Biorheology* 1977; 14:247-51.
5. De Simone G, Devereux RB, Chien S, Alderman MH, Atlas SA, Laragh JH. Relation of blood viscosity to demographic and physiologic variables and to cardiovascular risk factors in apparently normal adults. *Circulation* 1990; 8:107-17.
6. Rosenson RS, McCormick A, Uretz EF. Distribution of blood viscosity values and biochemical correlates in healthy adults. *Clin Chem* 1996; 42(8):1189-95.

MODULAZIONE FARMACOLOGICA DELLA DEFORMABILITÀ ERITROCITARIA

Maurizio Govoni, Vanda Randi

Struttura Semplice Raccolta Sangue Intero ed Aferesi Produttiva, Servizio di Immunopatologia e Trasfusionale, Ospedale Maggiore, Bologna

Viscosità ematica e deformabilità eritrocitaria

La viscosità del sangue intero dipende dal delicato equilibrio di molteplici fattori che interagiscono tra loro in maniera complessa: concentrazione e tipologia delle proteine plasmatiche; concentrazione e deformabilità delle emazie e degli altri elementi corpuscolari del sangue; effetto emodinamico dello *shear stress* su globuli rossi e piastrine (1).

Il grado di deformabilità della membrana eritrocitaria gioca, in questo contesto, un ruolo di rilevante interesse (2); numerose sono infatti in letteratura le segnalazioni di alterazioni della viscosità ematica riconducibili in maniera significativa a modificazioni della deformabilità eritrocitaria (3).

La deformabilità eritrocitaria può essere considerata come l'insieme delle caratteristiche di plasticità ed elasticità che consentono al globulo rosso di attraversare sinusoidi con diametro inferiore alla metà del suo diametro maggiore (4).

La deformabilità della emazia rappresenta la risultante del complesso e delicato equilibrio di molteplici fattori, sia intrinseci che estrinseci all'eritrocita stesso (5). Sostanzialmente sembrano comunque essere tre le componenti preponderanti che determinano la deformabilità eritrocitaria: la fluidità della membrana, la viscosità citoplasmatica e il rapporto area di superficie/volume cellulare.

La fluidità della membrana dipende dalla integrità delle componenti lipidica e proteica della membrana, dalle loro interazioni intrinseche e estrinseche oltre che da un complesso meccanismo di regolazione comprendente la glicolisi anaerobica, il metabolismo energetico, i processi di fosforilazione e defosforilazione, la concentrazione di Ca^{++} , il ciclo del fosfatidil inositolo, i fenomeni ossidativi e gli enzimi proteolitici (5).

La viscosità interna citoplasmatica dipende sostanzialmente dalle caratteristiche qualitative e quantitative della emoglobina. Emoglobine instabili (C,S) e anomala sintesi di catene globiniche (Sindromi talassemiche) sono infatti associate ad evidente riduzione della deformabilità eritrocitaria (5).

Il rapporto area di superficie/volume cellulare può presentare condizioni di incremento o riduzione. La riduzione di questo rapporto si traduce costantemente in un decremento della plasticità del globulo rosso; questo si può realizzare per un incremento del volume con area di superficie invariata (sferocitosi preemolitica) ovvero per una riduzione della superficie con volume costante (alterazione della membrana conseguenza di un danno esogeno o endogeno) (5).

Metodiche di misurazione della deformabilità eritrocitaria. La filtrabilità eritrocitaria

Numerose sono le tecniche di misurazione della deformabilità eritrocitaria descritte in letteratura. In questo ampio panorama di proposte trovano collocazione le metodiche più

disparate: da quelle estremamente semplici e accessibili come la valutazione differenziale del valore ematocrito apparente misurato dopo centrifugazione a bassa e alta velocità (6) ad altre dalla elevata complessità e costo degli apparati quali le tecniche di aspirazione in micropipette e l'ektacitometria (6). Se le metodiche sopra ricordate possono essere considerate da un lato troppo semplicistiche o dall'altro economicamente inavvicinabili o sperimentali, la misurazione della filtrabilità eritrocitaria rappresenta un buon compromesso di sensibilità, affidabilità e accessibilità, sia utilizzando dispositivi realizzati "artigianalmente" che con apparecchiature reperibili sul mercato (6).

Svariate sono le metodiche riportate in letteratura per la misurazione della filtrabilità dei globuli rossi. Il primo lavoro risale al 1967 (7), ma la tecnica più conosciuta e utilizzata è quella descritta da Reid *et al.* nel 1976 (8).

Sostanzialmente le metodiche di filtrazione prevedono il passaggio di sospensioni più o meno diluite di globuli rossi attraverso filtri con porosità variabili, a flusso o pressioni costanti, misurando rispettivamente la pressione od il flusso.

La misurazione risulta particolarmente sensibile al rapporto area di superficie/volume cellulare e, utilizzando filtri con pori di 3 micron di diametro nominale, anche il volume cellulare.

L'affidabilità delle metodiche di filtrazione deve essere attentamente controllata, monitorando in modo particolarmente accurato alcuni fattori extraeritrocitari, in particolare: temperatura, osmolarità e pH del mezzo di sospensione, contaminazione della sospensione eritrocitaria da parte di cellule della serie bianca, caratteristiche dei filtri utilizzati e infine ematocrito e componenti plasmatiche (9) per le metodiche che prevedono l'impiego del sangue intero.

Molecole in grado di modulare la deformabilità del globulo rosso

Si è tentato più volte di agire farmacologicamente sulla plasticità della membrana del globulo rosso per correggere indirettamente alterazioni della viscosità ematica totale (10).

Numerose sono, allo stato attuale della letteratura, le sostanze di cui è supposta o dimostrata la possibilità di influenzare, *in vivo* od *in vitro*, la deformabilità dell'eritrocita.

L'ossipentifillina ovvero pentossifillina è un derivato dimetilxantinico di cui è conosciuta da tempo l'efficacia nel migliorare la claudicatio intermittente su base ateromastica e nell'incrementare il flusso cerebrale riducendo la frequenza degli episodi di ischemia cerebrale transitoria (11).

L'azione del farmaco, migliorativa sulla deformabilità eritrocitaria, si suppone sia mediato dall'effetto sulla fosforilazione delle proteine di membrana, dallo stimolo della glicolisi attraverso l'incremento della permeabilità della membrana del globulo rosso al glucosio oltre ad una maggiore disponibilità di cAMP, ATP e 2,3DPG, dallo stimolo della attività Na⁺/K⁺ ATPasica di membrana e dall'effetto sulla concentrazione intracellulare di ioni Ca⁺⁺ e alla loro chelazione a livello della membrana eritrocitaria (7).

Gli acidi grassi omega-3 polinsaturi, sia come supporto dietetico che come complesso farmacologico, sarebbero in grado di produrre una favorevole modulazione della viscosità ematica dovuta principalmente ad una migliore performance della deformabilità eritrocitaria (12).

È stato ipotizzato che tale risultato possa essere legato alla integrazione di questi composti nei fosfolipidi di membrana con la conseguente alterazione del rapporto tra fosfolipidi con catene aciliche insature (associati a membrane altamente fluide) e fosfolipidi con catene aciliche sature (associati a membrane a bassa fluidità). Il sovvertimento di questo rapporto a favore della componente lipidica non satura genererebbe una maggiore fluidità dei lipidi quindi, più genericamente, della membrana cellulare (13).

Il rinnovo dei fosfolipidi del versante esterno della membrana eritrocitaria avverrebbe per scambio diretto di molecole intatte con la controparte lipoproteica plasmatica (14), mentre i fosfolipidi del versante interno sarebbero rigenerati mediante incorporamento di acidi grassi liberi nei fosfolipidi (15).

Pertanto, l'incorporamento nella membrana eritrocitaria di acidi grassi omega-3 derivati potrebbe essere spiegato sia ammettendo uno scambio di fosfolipidi tra il plasma e la membrana del globulo rosso, sia pure ipotizzando una acilazione di lisofosfolipidi.

L'assunzione di morfina è stata associata con una significativa riduzione della deformabilità eritrocitaria. L'effetto negativo di questo farmaco sulla deformabilità sarebbe determinato da una ridotta fluidità lipidica (la molecola interagirebbe con i lipidi del doppio strato grazie alla sua componente idrofobica) oltre che da un sovvertimento della normale architettura delle proteine di membrana (16).

In vitro è largamente documentato l'effetto favorevole sulla deformabilità eritrocitaria di Gangliosidi, Zinco ed estratti di angelica. Il loro meccanismo d'azione si impernia sul controllo, operato con modalità diverse, della concentrazione intracellulare di ioni Ca^{++} con un conseguente effetto protettivo sulla disidratazione cellulare conseguente alla perdita di ioni K^{+} (effetto "Gardos"), sul danno alle proteine di membrana conseguente alla attivazione di enzimi proteolitici citosolici e/o di membrana e sulla attivazione della fosfolipasi C di membrana responsabile della riduzione della concentrazione di fosfatidil inositolo difosfato fondamentale per le interazioni tra proteine del citoscheletro e di transmembrana (17, 18).

I flavonoidi sono prodotti vegetali di basso peso molecolare caratterizzati da uno spettro di attività biologica molto ampio: antinfiammatoria, antiepatotossica, antiaggregante, antispastica, antitumorale, antimicrobica, antivirale, antiallergica e altre ancora tra le quali anche quella favorevole sulla deformabilità eritrocitaria (19).

È dimostrata l'efficacia dei flavonoidi nell'inibire numerose attività enzimatiche inclusa la cAMP fosfodiesterasi; questa azione comporta l'incremento della concentrazione di cAMP che, come nel caso della pentossifillina, sarebbe il principale responsabile dei benefici effetti reologici osservati (19).

Nitrati, nitriti e trinitrina si comportano *in vitro* in maniera diversa sulla deformabilità della emazia. In verità occorre precisare che tutte e tre le molecole agiscono modificando il rapporto colesterolo libero + fosfolipidi e proteine di membrana, tuttavia questa azione si traduce in un miglioramento della plasticità del globulo rosso solamente per nitrati e trinitrina; nel caso dei nitriti l'effetto favorevole viene inficiato dal concomitante effetto negativo rappresentato dalla produzione di metaemoglobina associata alla presenza di questa molecola (20).

Modulazione della deformabilità eritrocitaria conseguente alla somministrazione *in vivo* di pentossifillina e acidi grassi omega-3 polinsaturi. Casistica personale

Pentossifillina

Sono stati studiati 20 pazienti eritrosici (10 affetti da policitemia vera e 10 da policitemia secondaria) nei quali il valore ematocrito era mantenuto entro limiti fisiologici mediante periodiche eritroaferesi. I pazienti sono stati accuratamente selezionati per garantire la omogeneità del campione, con particolare attenzione ai principali parametri eritrocitari di rilevanza emoreologica. Questi pazienti sono stati suddivisi in due gruppi comprendenti l'uno 10 soggetti trattati con 800 mg/die (suddivisi in due somministrazioni di 400 mg ciascuna) di pentossifillina (21), l'altro 10 soggetti non trattati con il farmaco. Come controlli sono stati utilizzati 20 soggetti adulti, sani, privi di alterazioni emoreologiche, ematologiche ed ematochimiche evidenti.

Per la misurazione della deformabilità eritrocitaria ci siamo avvalsi di una metodica di filtrabilità eritrocitaria (22) da noi approntata modificando il metodo originariamente descritto da Reid *et al.* La metodica prevedeva sostanzialmente la filtrazione di sospensioni eritrocitarie deleucocitate ad ematocrito controllato (30.000 RBC x μ l) su filtri di policarbonato aventi pori del diametro nominale di 3 micron. Come liquido di lavaggio dei globuli rossi e per la loro sospensione veniva utilizzato un tampone di fosfati, pH 7,4, addizionato di glucosio 11,1 mM e albumina umana 5g/l. La filtrazione veniva effettuata a +37 °C entro 2 ore dal prelievo del campione di sangue raccolto in ACD-A 1:8 (v/v).

I tempi della filtrabilità eritrocitaria si sono dimostrati più elevati nel gruppo dei soggetti eritrosici (trattati e non trattati con pentossifillina) rispetto al corrispondente gruppo dei controlli (Figura 1). La differenza è risultata essere statisticamente significativa ($P < 0,001$).

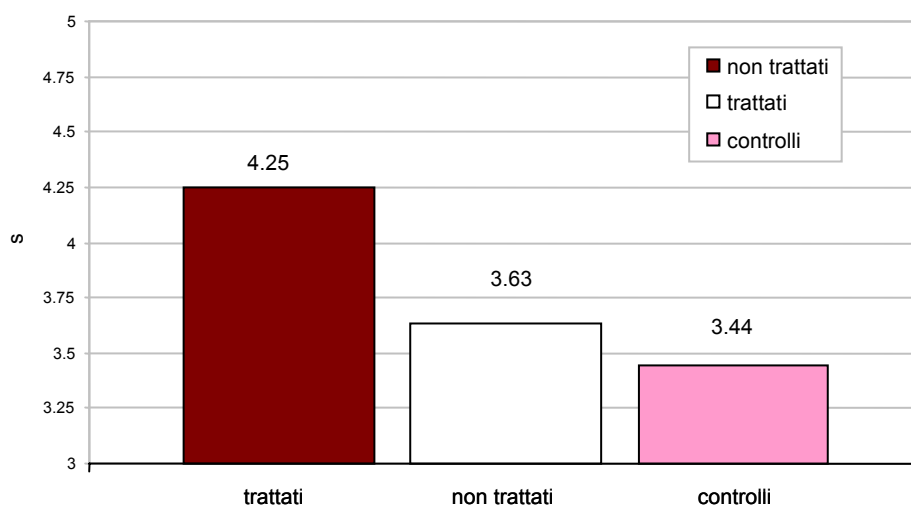


Figura 1. Pentossifillina e filtrabilità eritrocitaria

All'interno del gruppo degli eritrosici, la filtrabilità eritrocitaria è risultata essere migliore nel gruppo dei trattati rispetto ai non trattati con pentossifillina. Anche in questo caso le differenze riscontrate hanno raggiunto significatività statistica ($P < 0,001$).

Filtrabilità eritrocitaria e viscosità ematica si sono inoltre dimostrate tra loro strettamente correlate sia all'interno del gruppo dei trattati ($P < 0,001$) che dei non trattati ($P < 0,001$), come pure dei controlli ($P < 0,001$).

Acidi grassi omega-3 polinsaturi

Sono stati organizzati due gruppi di volontari composti ciascuno di 8 individui di sesso maschile, sani, privi di alterazioni ematologiche, ematochimiche ed emoreologiche evidenti.

Ad ogni individuo del gruppo "trattati" sono stati somministrati 3 g/die di un complesso di acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA) (23) suddivisi in tre somministrazioni giornaliere, per la durata complessiva di 16 settimane; nessuna somministrazione è stata effettuata nel gruppo "controlli".

Per i soggetti di entrambi i gruppi si è cercato inoltre di osservare una accurata astensione farmacologica e un regolare apporto dietetico da almeno due settimane prima dell'inizio della sperimentazione, sino al completamento della stessa.

Per la valutazione della deformabilità dei globuli rossi ci siamo serviti della stessa metodica di filtrabilità eritrocitaria da noi messa a punto e utilizzata nella sperimentazione con la pentossifillina.

Mediante gas-cromatografia è stato inoltre indagato il contenuto di EPA nelle membrane eritocitarie al termine del periodo di sperimentazione.

I campioni di sangue venoso per la valutazione della filtrabilità eritrocitaria sono stati raccolti al tempo 0, dopo 4, 8 e 16 settimane di sperimentazione.

I dati raccolti hanno evidenziato un significativo miglioramento della filtrabilità eritrocitaria nel gruppo dei trattati ($P < 0,001$) (Figura 2).

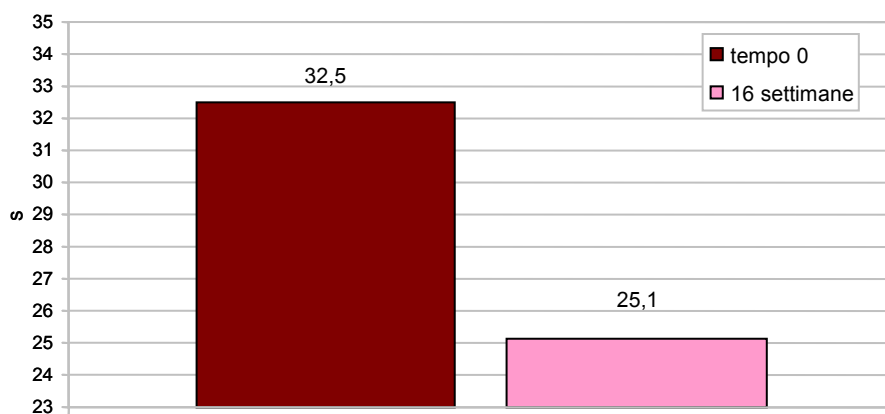


Figura 2. Acidi grassi omega-3 polinsaturi e filtrabilità eritrocitaria

Mediamente la riduzione dei tempi di filtrazione è stata del 10% (range 5-17%).

Il risultato favorevole diventava evidente dopo la quarta settimana di sperimentazione, raggiungendo il valore massimo tra la ottava e la sedicesima settimana per poi rimanere sostanzialmente invariato.

Nel gruppo dei soggetti di controllo non si sono evidenziate variazioni di rilevanza statistica. (Figura 3)

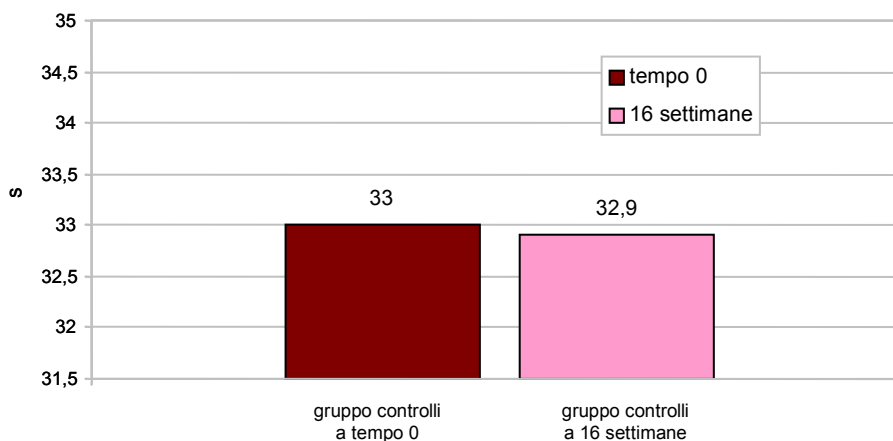


Figura 3. Acidi grassi omega-3 polinsaturi e filtrabilità eritrocitaria

Nei soggetti trattati è stata inoltre riscontrata una elevata correlazione ($P < 0,001$) tra contenuto in EPA delle membrane e grado di deformabilità eritrocitaria espressa come tempo di filtrazione.

Considerazioni conclusive

Numerosi sono in letteratura gli studi che dimostrano significative alterazioni della viscosità ematica in svariate patologie; in molti casi questa alterazione è riconducibile in maniera preponderante a modificazioni della deformabilità eritrocitaria.

Sono peraltro numerose le osservazioni, condotte sia *in vivo* che *in vitro*, di molecole in grado di influenzare, con meccanismi diversi, il grado di deformabilità dell'eritrocita.

Riteniamo pertanto che possa essere di grande utilità, in condizioni di alterazione clinicamente significativa della viscosità ematica (dovuta in tutto o in parte ad alterazione della deformabilità eritrocitaria), tenere in debita considerazione l'opportunità di utilizzare nel protocollo terapeutico anche le suddette molecole.

Bibliografia

1. Dormandy JA, Matrai A. Assessment of pharmacological agents with a hemorheological action. *NY Acad Sci* 1983; 416:599-610.
2. Chien S, Usami S, Dellembach RJ, Gregersen MI. Blood viscosity. Influence of erythrocyte deformation. *Science* 1967; 157:827-34.
3. Bessis M, Mohandas N. Deformability of normal, shape-altered and pathological cells. *Blood Cells* 1975; 1:325-835.
4. Card RT, Mohandas N, Mollison PL. Relationship of posttransfusion viability to deformability of stored red cells. *Br J Haematol* 1983; 53:237-240.
5. Biovin P. Biochemical parameters of red blood cell deformability. *Clin Hemorheol* 1987; 7:25-32.
6. Govoni M, Lunghi M, Lodi GL, Reverberi R. Metodiche di misurazione della deformabilità eritrocitaria. *La Trasfusione del Sangue* 1995;40:374-378.
7. Teitel P. Le test de la filtrabilité érythrocytaire. Une méthode simple d'étude de certaines propriétés microrheologiques des globules rouges. *Nouv Rev Franç Hemat* 1967; 7:195-201.
8. Reid HL, Barnes AJ, Lock PJ, Dormandy JA, Dormandy TL. A simple method for measuring erythrocyte deformability. *J Clin Pathol* 1976; 29:855-858.
9. Reverberi R, Govoni M, Menini C. Measuring erythrocyte filtrability: factors influencing sensitivity and reproducibility. *La Trasfusione del Sangue* 1991; 4:582-586.
10. Lowe GDO. Evaluation of rheological therapy by orally administered drugs. *Clin Hemorheol* 1984;4:159-167.
11. Blito YY, Player M, West MJ, Ellory JC, Stuart J. Effects of oxpentifylline on erythrocyte cation content, hydration and deformability. *Clin Hemorheol* 1987; 7:561-577.
12. Kobayashi S, Hirai A, Terano T. Reduction in blood viscosity by eicosapentaenoic acid. *Lancet* 1981; 2(8239):197.
13. Cooper RA. Abnormalities of cell membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med* 1977; 297:371-377.
14. Reed CF. Phospholipids exchange between plasma and erythrocyte in man and the dog. *J Clin Invest* 1968; 47:749-756.

15. Renooy W, Van Golde LMG, Zwaal RFA. Preferential incorporation of fatty acids in the inside of human erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1974;363:287-294.
16. Xin N, Zong-yao W, Zong-yi Y, Lixin H, Dasong S, Boji C. Effects of morphine on rheological properties of rat red blood cells. *Clin Hemorheol and Microcirculation* 2000; 22:189-195.
17. Lipovac V, Gavella M. Rheological action of gangliosides on human erythrocytes. *Clin Hemorheol* 1994; 14:347-353.
18. Khaled S, Brun JF, Cassanas G, Bardet L, Orsetti A. Effects of zinc supplementation on blood rheology during exercise. *Clin Hemorheol and Microcirculation* 2000; 20:1-10.
19. Blito YY, Abdalla SS. Effects of selected flavonoids on deformability, osmotic fragility and aggregation of human erythrocytes. *Clin Hemorheol and Microcirculation* 1998; 18:165-173.
20. Zkhiri F, Garnier M, Garnier J, Nicolas P, Perret G. The action of derived products nitrosin on human erythrocyte deformability *in vitro*. *Clin Hemorheol* 1993; 13:481-489.
21. Govoni M, Reverberi R. Modulazione farmacologica della deformabilità eritrocitaria. Effetto dell'impiego della pentossifillina in pazienti eritrosici. *La Trasfusione del Sangue* 1992; 37:863-866.
22. Govoni M. Deformabilità eritrocitaria durante la conservazione del sangue. Confronto fra cinque diverse soluzioni. *Atti dell'Accademia delle Scienze di Ferrara* 1988; 65:281-287.
23. Govoni M, Lunghi M, Lodi GL, Casoni I, Guglielmini C, Cappi F. Acidi grassi omega-3 polinsaturi e deformabilità eritrocitaria. *La Trasfusione del Sangue* 1996;41:92-95.

IL RUOLO DELLA FLUIDODINAMICA NEGLI ORGANI ARTIFICIALI: TECNICHE DI MISURA

Mauro Grigioni, Carla Daniele, Giuseppe D'Avenio, Umberto Morbiducci, Costantino Del Gaudio,
Antonio Balducci, Mara Abbate, Vincenzo Barbaro
Laboratorio di Ingegneria Biomedica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Le tecnologie del settore cardiovascolare sono rappresentate da numerosi tipi di dispositivi, attivi e passivi, per l'assistenza durante le operazioni chirurgiche, per il recupero della funzionalità cardiaca e lo svezzamento post-operatorio, o per la sostituzione definitiva di funzioni vitali.

La valutazione dell'impatto di queste tecnologie viene eseguito per comprendere quale sia l'esito delle applicazioni (statistiche di sopravvivenza, complicanze, ecc.) sia per quantificare i costi per il Servizio Sanitario Nazionale (costi dei dispositivi, del servizio prestato, delle terapie associate e infine del trattamento delle complicanze conseguenti).

I dispositivi correntemente studiati presso l'Istituto Superiore di Sanità sono le valvole cardiache protesiche, le endoprotesi (*stent* e *graft*), le assistenze ventricolari e i dispositivi per circolazione extracorporea. Lo studio del campo di flusso a valle di questi dispositivi medici artificiali e specialmente di valvole cardiache protesiche o i ventricoli artificiali è indispensabile per caratterizzare la possibilità che, una volta impiantate, esse producano un danno a carico dei costituenti ematici, a causa del livello di turbolenza generato. Presso il laboratorio di Ingegneria Biomedica dell'Istituto Superiore di Sanità è in corso da anni un programma di misura del flusso turbolento generato da valvole protesiche di piccola taglia secondo le indicazioni della *Food and Drug Administration* americana. Il campo di flusso è stato investigato mediante tecnica *Laser* e ad ultrasuoni come l'anemometria *Laser Doppler* e la *Particle Image Velocimetry*, che consentono misure accurate e non invasive di flussi turbolenti.

Dispositivi cardiovascolari: impatto sulla reologia

Dalla prima esperienza con una valvola cardiaca a palla ingabbiata (1957) sono state impiantate più di 3 milioni di protesi valvolari, solo dal 1980 ad oggi ne sono state impiantate nel mondo circa 1,5 milioni di vari tipi, ma tre modelli principali hanno avuto la massima diffusione: le protesi in tessuto biologico che fanno uso del pericardio bovino o della valvola naturale del maiale, le protesi meccaniche monodisco e le protesi meccaniche a doppia flangia, realizzate a partire da leghe metalliche e carbonio pirolitico. Una valvola protesica ha un costo che si aggira intorno ai 10 milioni di lire e il suo impianto nell'uomo può durare da un minimo di 7 anni nel caso delle valvole in tessuto biologico ai 10-15 nel caso delle protesi meccaniche; in quest'ultimo caso la durata massima ipotetica (in laboratorio) potrebbe essere di oltre 400 anni.

Le valvole in tessuto biologico sono generalmente preferite per l'impianto nell'anziano per la loro funzionalità più vicina a quella naturale, la cui complicanza più grave è la degenerazione calcifica, mentre le protesi meccaniche sono preferite per la loro durata per tutte le altre età,

nonostante necessitino di un trattamento anticoagulante continuamente controllato, per evitare le complicanze di tipo trombo-embolico. Agli inizi del 1980 le protesi in tessuto biologico ebbero molta fortuna con un mercato globale pari a quello delle meccaniche, mentre in seguito si affermò la protesi a doppia flangia riducendo il mercato delle altre due. Già nel 1992 le protesi a doppia flangia rappresentavano la metà di tutti gli impianti e oggi sono le preferite nelle sostituzioni valvolari essenzialmente per i bassi gradienti pressori. Esiste un nuovo mercato per le valvole in tessuto biologico grazie al modello *stentless* (senza supporto) che permette ai chirurghi una tecnica di impianto cosiddetta “a stile libero” che rende possibile risolvere molte patologie complicate (es. in radici aortiche danneggiate) ottimizzando le prestazioni emodinamiche senza la necessità di terapia anticoagulante. Il mercato delle monodisco oggi rappresenta oggi solo il 5% del totale degli impianti.

In Italia, da studi anatomico-patologici resi possibili dal database degli espunti realizzato presso l'Università di Padova, si evince che alla fine degli anni '60 la maggior parte delle sostituzioni valvolari erano dovute alla patologia reumatica (specie a carico della valvola mitrale) mentre attualmente è risultata prevalente la patologia degenerativa della valvola naturale aortica.

L'incidenza di trombosi, generalmente più rilevante per la valvola mitrale ma comunque presente per tutte le protesi meccaniche, è di 0,15 anni/paziente, e l'evento non appare dipendente direttamente dal tipo di valvola ma più probabilmente da ascrivere alle condizioni patologiche del paziente. Recenti studi internazionali hanno infatti dimostrato che anche diminuendo il trattamento anticoagulante nel caso delle protesi meccaniche il rischio di trombosi non aumenta in modo correlato con il tipo di valvola. Infine incidenza crescente è riportata per la formazione del pannus biologico, reazione che si sviluppa a partire dall'inserzione di un corpo estraneo nel torrente sanguigno. Un brevetto per la deposizione di carbonio su tutti i materiali già impiegati nel settore cardiovascolare dai metalli e le leghe (Titanio e Stellite) ai polimeri (PET, Dacron) al fine di aumentare il grado di biocompatibilità delle superfici estranee a contatto con il sangue, è stato riportato in letteratura ridurre il panno fibroso nel caso valvolare e l'occlusione delle protesi vascolari (*bypass*).

La possibilità di migliorare la durata a lungo termine delle valvole in tessuto biologico rappresenta infatti un grande risultato liberando i portatori di valvola dalla terapia anticoagulante necessaria nel caso delle protesi meccaniche e fornendo loro una funzionalità più naturale rispetto alle più trombogeniche valvole meccaniche per via della superficie estranea a contatto del sangue e della fluidodinamica meno naturale di queste ultime.

A proposito della valutazione del potenziale emolitico e trombogenico delle protesi valvolari meccaniche, studi velocimetrici *Laser Doppler* o *Particle Image* vengono realizzati presso l'Istituto Superiore di Sanità. Queste metodiche allo stato dell'arte impiegate presso il Dipartimento di Tecnologie e Salute hanno finora permesso non solo la caratterizzazione accurata del campo di flusso generato dalla presenza di dispositivi artificiali come le valvole cardiache o i ventricoli artificiali, ma hanno permesso di definire un nuovo valore della soglia del danno agli eritrociti prodotta dalla emodinamica turbolenta prodotta dagli stessi dispositivi, con importanti conferme in recenti studi condotti direttamente sul sangue, presso laboratori europei.

Le complicanze post impianto rappresentano sia la limitazione della qualità della vita del paziente ma anche il maggior aggravio per il Servizio Sanitario Nazionale. Tenendo conto che una protesi costa all'incirca 5 mila dollari, il costo maggiore nel caso delle sostituzioni valvolari è dovuto proprio al trattamento delle complicazioni; studi americani riportano un costo maggiore di 30.000 dollari per evento nel caso di trombosi valvolare, endocardite o disfunzioni non strutturali, mentre embolismi ed episodi emorragici costano circa 8.000-11.000 dollari per

evento; quando tuttavia si guarda al trattamento continuo e alle conseguenze di episodi di embolismo su un periodo di 15 anni si raggiungono i 70.000 dollari.

Nel caso di endoprotesi si identificano il disadattamento di impedenza (delle proprietà biomeccaniche) delle protesi vascolari impiantate nell'albero arterioso assieme alla reazione da corpo estraneo come cause primaria di crescita di tessuto all'interno delle protesi; modelli animali di modificazione del tono vascolare hanno correlato l'oscillazione dello stress di parete con i siti di iperplasia miointimale, confermando che le condizioni di lavoro biomeccaniche locali sono associabili statisticamente all'insuccesso delle protesi specie nel caso di piccoli vasi, mentre a livello della chirurgia l'attenzione allo stretching del vaso protesico durante l'impianto può prevenire il *kinking* e migliorare il mantenimento di una *compliance* vascolare più vicina a quella dell'albero arterioso anche dopo mesi dall'impianto come dimostrato con prove di fatica *in vitro*.

L'impianto di stent coronarico è stato reso necessario per ridurre le complicanze conseguenti alla espansione delle placche ateromatose responsabili dell'infarto al miocardio, mediante la tecnica dell'angioplastica percutanea (*Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty*, PTCA); questa tecnica infatti soffre del fenomeno della restenosi a breve termine. L'uso di uno stent, che realizza una impalcatura all'interno delle arterie coronarie permette di migliorare l'aspettativa di vita, riducendo in alcuni studi randomizzati anche del 40% le complicanze della PTCA.

Infine per quanto riguarda i dispositivi di assistenza ventricolare, emerge dalla letteratura e dalle ricerche svolte in Italia la necessità della definizione di protocolli e procedure di attuazione orientati al compito specifico; infatti, se fino ad ora si è pensato al bridge al trapianto come applicazione elettiva di questo tipo di dispositivi, attualmente prevale la necessità di superare l'esiguo numero di organi a disposizione per il trapianto, trattando buona parte dei pazienti cardiopatici con terapie di assistenza temporanea per ottenere il recupero del cuore naturale e più recentemente con dispositivi per il supporto a vita nelle patologie non più trattabili. Nel caso di miopatie gravi la metodica è stata già validata come applicabile sia a flusso pulsatile che continuo (esperienze sia americane che europee) con sopravvivenza a due anni anche del 70% con almeno il 60% dei pazienti vivi e non trapiantati.

La diffusione di queste tecniche tuttavia passa per la strettoia scientifica dell'individuazione affidabile dei parametri di valutazione della macchina e delle condizioni del paziente per valutarne il recupero, come messo in evidenza dagli studi effettuati sempre nell'ambito del SSN.

Infine una altra classe di dispositivi è rappresentato dalle apparecchiature di supporto alla chirurgia a cuore battente. Questi sono i sistemi di circolazione extra-corporea che costituiscono un indispensabile strumento in tutti quei casi nei quali risulta impossibile intervenire chirurgicamente sul cuore battente. La funzione meccanica del cuore di "pompare" il sangue e quella dei polmoni di garantire lo scambio gassoso devono allora essere in qualche modo sostituite e controllate dall'esterno. Tutto ciò implica un passaggio del sangue all'esterno del corpo e un conseguente contatto con superfici "estranee", evento assai traumatico, con emodinamica del tutto innaturale.

Negli ultimi anni, la accresciuta sensibilità nei confronti della durata dei tempi di recupero post-operatori ha fornito un'ulteriore e decisiva spinta nella direzione di rendere il meno traumatico possibile per la parte corpuscolata del sangue, l'evento "extra-circolatorio": ciò che si sta tentando di fare è riprodurre quanto più possibile le condizioni fisiologiche, o quantomeno avvicinarvisi.

Su questo binario si muove ad esempio il passaggio da una CEC a flusso continuo ad una a flusso pulsatile, imponendo forme d'onda fisiologiche alla pompa; oppure il passaggio ad un sistema di tipo ricoperto con materiali biocompatibili, orientato magari nella direzione di presentare un "habitat naturale" al passaggio del sangue, evitando così di innescare meccanismi di reazione da contatto con superfici non riconosciute come autologhe.

La minimizzazione del volume di sangue che la pompa usa per il riempimento del circuito, ha spinto verso la integrazione di alcuni componenti del circuito di circolazione extra-corporea, come ad esempio scambiatori di calore e moduli ossigenanti, cardiotomi e riserve venose. Vi sono anche tentativi di integrare la pompa con l'ossigenatore. Tale tendenza all'integrazione deve fare però i conti con l'esigenza di modularità dettata dal vantaggio di poter utilizzare dei prodotti che siano monouso, nonché con problemi di tipo geometrico, questi ultimi strettamente legati alla fluidodinamica e quindi al fenomeno dell'emolisi di tipo meccanico.

Lo sforzo di taglio nella emodinamica fisio-patologica

Nella circolazione arteriosa fisiologica generalmente non si hanno fenomeni di turbolenza a meno di incontrare condizioni patologiche come stenosi o geometrie particolari (magari congenite) dell'albero arterioso. Gli idraulici usano il numero di Reynolds per individuare le condizioni prone a sviluppare turbolenza. Questo parametro è adimensionale e rappresenta l'equilibrio delle forze inerziali con quelle viscosi. Generalmente quando questo numero è inferiore a 2000-3000 il flusso è considerato laminare o in fase di transizione verso la turbolenza. Generalmente un flusso laminare in un tubo ha il profilo riportato in Figura 1, che se il tubo è sufficientemente lungo diviene parabolico e non cambia più. Tale profilo è il profilo costituito dai valori del vettore velocità misurato in ogni punto del diametro del tubo (vaso). Generalmente e in termini molto semplici si può dire che a questo profilo è associato uno stress meccanico sui filetti fluidi passanti per un punto, pari al gradiente di velocità in quel punto per la densità del fluido. Il valore massimo si ottiene dove il profilo incontra le pareti del vaso. Ciò non è più vero quando si ha turbolenza ($Re > 3000$) perché le zone a più alto gradiente di velocità (*shear rate*) trasferiscono la loro energia cinetica alla creazione di vortici sempre più piccoli fino a che parte di questa energia viene poi dissipata (alle scale dimensionali più piccole). Anche il profilo di velocità quindi sarà solo un profilo medio ma sarà caratterizzato da una ampia variabilità nelle determinazioni sperimentali di velocità. Da queste considerazioni parte lo studio statistico della turbolenza.

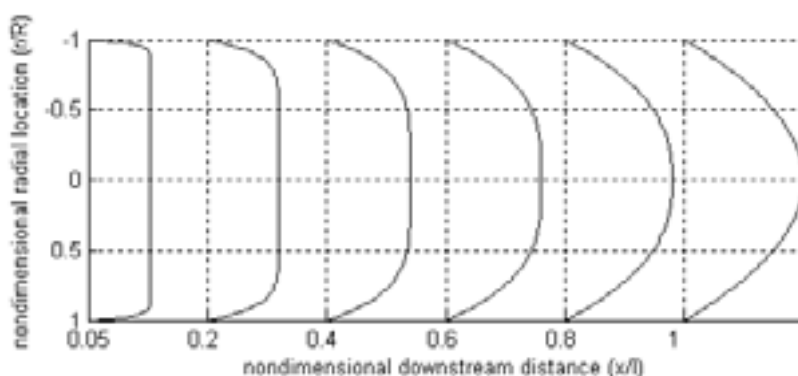


Figura 1. Sviluppo del profilo parabolico a partire da un profilo di entrata piatto in un tubo di flusso con diametro costante (l =entrance length; R =raggio del vaso)

Nella risoluzione di problemi legati alla fluidodinamica del sangue, un utile obiettivo è rappresentato dal poter predire il carico meccanico che agisce sulla componente ematica

corpuscolata. Ciò equivale alla possibilità di poter valutare lo sforzo di taglio in ogni punto del campo di moto, possedendo tale grandezza una elevata influenza nella induzione di traumi emolitici e subemolitici, adesione e formazione di trombi su superfici artificiali, nonché in fenomeni di aggregazione piastrinica. Pertanto lo sforzo di taglio rappresenta una quantità che riveste una rilevanza clinica significativa, nel processo di valutazione dei dispositivi biomedicali attraverso i quali viene fatto fluire il sangue.

Nei grandi vasi, in condizioni fisiologiche lo *shear rate* sulla parete dei vasi stessi non supera il valore di 800 s^{-1} (1).

L'ipotesi di sommabilità del danno prodotto sulle cellule del sangue soggetto ad un carico meccanico (2, 3), implica un graduale, irreversibile deterioramento della parte corpuscolata del sangue stesso: occorre tenere in conto che anche livelli apparentemente bassi di sforzo di taglio agenti sui corpuscoli sanguigni possono dar luogo a problemi clinici. Durante una circolazione extracorporea per esempio, il sangue attraversa dispositivi artificiali ripetutamente: studi *in vitro* hanno mostrato come 100 minuti di *bypass* possano produrre, in presenza di uno sforzo di taglio medio (considerando tutto il circuito di circolazione extracorporea) di 13,2 Pa, 113 mg% di emoglobina libera, nonché lisi di globuli bianchi e piastrine (4).

Inoltre occorre sottolineare come la presenza di valori di *shear rate* superiori a quelli fisiologici provochi una enfattizzazione di fenomeni cellulari sublitici, con conseguenze significative: sforzi di taglio sublitici sono in grado di produrre lievi alterazioni cellulari, stimolando adesione e aggregazione piastrinica; inoltre è stato osservato come danni non letali subiti dai globuli rossi, dovuti alla deformazione della membrana con conseguente rilascio di potassio, ATP e 2,3-DPG, avvengano in presenza di sforzi di tipo meccanico assai inferiori a quelli necessari a causare la distruzione dell'eritrocita (5).

Il componente intracellulare ADP, che gioca un ruolo cruciale nei fenomeni di emostasi e trombosi, in presenza di sforzi di taglio quali quelli prodotti da una circolazione extracorporea viene rilasciato dall'eritrocita danneggiato dal carico meccanico subito, ed è in grado di attivare il fenomeno di aggregazione piastrinica (6). I microaggregati sono sospettati di essere la causa di occlusioni di microvasi, nonché della occlusione delle fibre cave degli ossigenatori, in presenza di circolazione extracorporea: tutto ciò implica una perdita di piastrine, con conseguente morbidità dei tessuti e disfunzione neurologica.

Altra possibile sorgente di implicazioni cliniche è rappresentata dalla presenza di superfici artificiali in contatto con il sangue; in tale condizione, è possibile possa verificarsi il fenomeno della adesione piastrinica, che rappresenta il primo stadio del processo in casacata che conduce alla generazione di trombi (è noto come il posizionamento di cateteri intravascolari sia associato al rischio di formazione di trombi). Fra le variabili più importanti che intervengono nel generare tale fenomeno si trova certamente la caratteristica del flusso sanguigno, essendo la interazione fra i componenti di un fluido complesso in scorrimento su una superficie solida e la superficie stessa dipendente dai fenomeni di trasporto di componenti critici in quel fluido.

Introduzione sulle tecniche anemometriche

Useremo come esemplificazione lo studio di Protesi Cardiache Valvolari (PCV) del tipo a doppia flangia correntemente utilizzate nella pratica clinica intrapreso presso il Laboratorio di Ingegneria Biomedica dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) già da diversi anni, nell'ambito di progetti di ricerca volti a caratterizzare opportunamente le prestazioni di vari tipi di dispositivi protesici per il sistema cardiovascolare come le valvole cardiache meccaniche a doppia flangia, il progetto più innovativo attualmente disponibile. Tale studio prevede l'utilizzo di un campo di flusso pulsatile ottenuto tramite un duplicatore d'impulsi che simula l'attività della pompa cardiaca

e del circolo sistemico; è stato opportunamente modificato il sistema dell'Università di Sheffield (Figura 2), per poter eseguire il puntamento di fascetti laser colorati senza problematiche relative al percorso ottico. Nella tecnica LDA sono state misurate, in condizioni fisiologiche, le velocità puntuali a valle di ciascuna valvola, per definire l'effetto del dispositivo sul campo fluidodinamico a una certa distanza dalla sezione di montaggio. Le tecniche di misura usate presso l'ISS sono l'anemometria *laser Doppler* (LDA) bidimensionale e tridimensionale e la *Particle Image Velocimetry* 2D e 3D, per mezzo delle quali possono essere misurate almeno due componenti di velocità di una particella transitante attraverso una regione di spazio limitata, detta volume di misura, individuata dall'intersezione dei fasci laser del sistema. Dalle misure contemporanee di due componenti di velocità si possono calcolare gli sforzi indotti per turbolenza sulle particelle passanti nella regione investigata. Questo tipo di studi ha particolare importanza nel caso di valvole protesiche e ventricoli artificiali con gli accessi realizzati spesso da cannulazioni, poiché le componenti corpuscolate del sangue sono soggette a fenomeni di deterioramento (deformazione plastica ed emolisi) quando vengono sottoposte a carichi meccanici dell'ordine di grandezza di quelli che possono essere riscontrati a valle di dispositivi impiantabili (7).

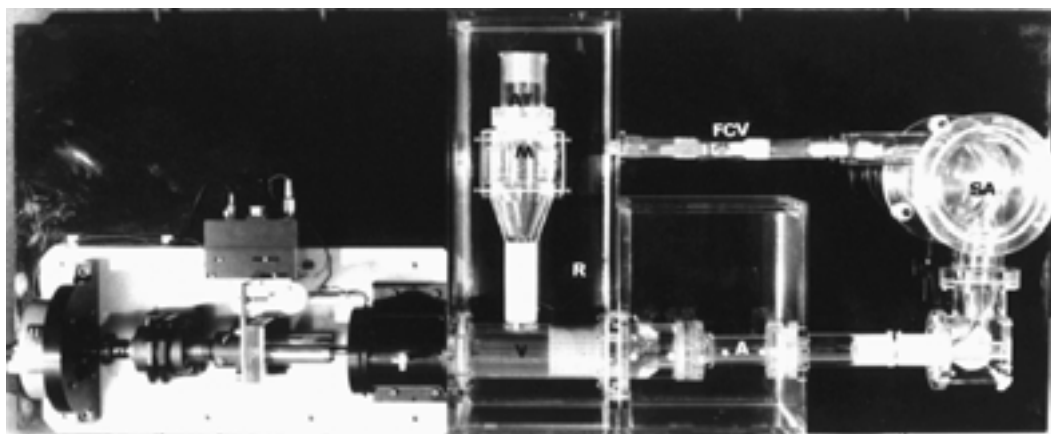


Figura 2. Duplicatore di impulsi dell'Università di Sheffield visto dall'alto. Le prove alle quali si fa riferimento nel testo sono state effettuate nella sezione aortica (A). Il fluido circola in senso antiorario nel sistema, sospinto dal pistone visibile in basso a sinistra nell'immagine

Nello studio sperimentale fluidodinamico e, in particolare, della turbolenza, è stata sempre avvertita l'esigenza di strumenti di misura aventi una sufficiente risoluzione, sia spaziale che temporale, per la caratterizzazione dei fenomeni in esame. La rapidità di variazione della velocità in un flusso turbolento, infatti, impone requisiti molto stringenti all'accuratezza con cui tali variazioni devono essere registrate. Un campo di grande rilevanza, nel quale l'anemometria *laser Doppler* eccelle, è costituito dallo studio dei fenomeni ad alta intensità relativa di turbolenza (rapporto locale fra deviazione standard degli scostamenti dalla velocità media e velocità media stessa), come è il flusso che attraversa una valvola artificiale. In questo caso si ha a che fare con misure di velocità intrinsecamente affette da un'alta varianza, il che implica la difficoltà di eseguire misure accurate, e la necessità di utilizzare strumenti che non introducano rumore. L'alta variabilità delle misure di velocità, dovuta sia alle caratteristiche statistiche della turbolenza, sia alla non stazionarietà del flusso cardiaco (periodicità) impone una precisa definizione dell'esperimento e delle condizioni di *averaging*, come vedremo in seguito.

Studio della turbolenza mediante LDA

Il principio fondamentale dell'anemometria *laser Doppler* consiste nell'estrazione di una data componente di velocità di una particella passante attraverso il volume di misura a partire dalla luce riflessa (*scattering*) da questa verso un ricevitore: secondo l'effetto Doppler, la luce riflessa ha una frequenza dipendente dal moto della particella, quindi la velocità di questa sarà proporzionale alla differenza di frequenza della luce riflessa dalla particella illuminata da una coppia di fasci laser di uguale lunghezza d'onda (è necessaria una coppia per ogni componente di velocità) (8). Un modello utile per visualizzare l'effetto dei fasci sulla particella è il cosiddetto modello a frange, basato sull'approssimazione del fascio laser come onda piana: in tale ipotesi, l'interferenza fra due fasci intersecantesi produce una serie di piani di massima e minima intensità (frange), equispaziati e allineati parallelamente alla bisettrice dei fasci, in modo che una particella passante per essi ritrasmette un segnale luminoso caratteristico, costituito da una gaussiana a cui è sovrapposto un segnale oscillatorio dipendente dalla distanza fra frange adiacenti (oltre che dalla proiezione della velocità della particella in direzione ortogonale alle frange).

Nello studio statistico della turbolenza, a partire dalla decomposizione di Reynolds (velocità istantanea U = velocità media $\bar{U}$ + fluttuazione istantanea u), è di grande importanza la misura delle velocità istantanee, ma anche delle fluttuazioni delle velocità attorno al valor medio, e delle correlazioni fra le fluttuazioni relative a direzioni tra loro ortogonali. Infatti il tensore di Reynolds $\overline{\rho u_i u_j}$ ($i, j=1,2,3$), definito appunto in termini di tali correlazioni, quantifica l'effetto della turbolenza, in termini di sforzi normali e di taglio esercitati su una particella passante per il punto di misura: i termini $\overline{\rho u_i u_j}$ (ρ : densità del fluido; u_i : fluttuazione istantanea della velocità in direzione x_i) rappresentano i primi se $i = j$, e i secondi quando $i \neq j$. Specificamente, la tecnica LDA 2D consente, mediante misure contemporanee di due componenti ortogonali di velocità per una stessa particella, di misurare direttamente le componenti fuori diagonale del tensore di Reynolds, senza dover ricorrere a estrapolazioni, non pienamente soddisfacenti dal punto di vista teorico (9), a partire da misure unidimensionali: ciò consente di valutare direttamente gli sforzi di taglio ai quali è sottoposto il fluido, il che è fondamentale nel caso del sangue fluente attraverso una valvola protesica, contenente una parte corpuscolata variamente composta (globuli rossi, piastrine, ecc.) soggetta a deterioramento meccanico se eccessivamente sollecitata.

È stato imposto un regime elevato (flusso medio: 6 l/min), secondo l'approccio della *worst case analysis*, così come suggerito dalla FDA (10). Considerato anche che le protesi studiate erano di grandezza molto piccola se non minima (diametro al montaggio di 19 mm, diametro interno dell'orifizio valvolare di 15,2 e 14,7 mm per il modello Sorin Bicarbon e per quello St. Jude Standard, rispettivamente), fra quelle correntemente utilizzate nella pratica clinica, si sono ottenuti valori di sforzo di taglio tra i più alti finora misurati per la turbolenza indotta da tali dispositivi.

Tramite le misure di componenti ortogonali di velocità, quindi, la tecnica LDA permette di quantificare lo sforzo di taglio al quale è sottoposto il fluido, il che è fondamentale nel caso del sangue fluente attraverso una valvola protesica, contenente una parte corpuscolata variamente composta (globuli rossi, piastrine, ecc.) soggetta a deterioramento meccanico se eccessivamente sollecitata. Ad esempio, emolisi oppure attivazione piastrinica sono alcune possibili conseguenze cliniche.

I campioni di velocità misurati erano relativi a una finestra di 50 ms centrata sul massimo flusso istantaneo, in modo da realizzare una condizione di quasi-stazionarietà, simile a quella ottenuta con sistemi a flusso stazionario a parità di regime idraulico. Questo aspetto sperimentale, unitamente all'alto regime (flusso medio: 6 l/min) con cui sono state provate le valvole, permette di considerare le misure effettuate come rappresentative del caso peggiore per la turbolenza sviluppata (concordemente con la raccomandazioni della FDA (10).

Realizzazione dell'esperimento in similitudine geometrica e cinematica

Lo studio del campo di flusso per un qualsiasi oggetto ivi immerso deve essere eseguito in condizioni documentate e ripetibili per poter poi valutare a posteriori le prestazioni fluidodinamiche con sufficiente oggettività. Queste considerazioni comportano generalmente la necessità di effettuare alcune semplificazioni rispetto al processo che si intende studiare. Nel caso delle valvole, ad esempio, un'indagine *in vitro* che riproduca esattamente le condizioni di funzionamento *in vivo* sarebbe di difficile realizzabilità, stante la difficoltà di disporre di materiali aventi le stesse proprietà meccaniche dei tessuti biologici a valle della valvola e, contemporaneamente, proprietà (ottiche, ecc.) adatte alla tecnica di misura usata. Il flusso a valle di ciascuna valvola è stato quindi confinato mediante una aorta opportunamente realizzata in vetro soffiato ad alta trasparenza, per mezzo di tre stampi in grafite realizzati, mediante fresatura, presso il laboratorio di Ingegneria Biomedica dell'ISS: evidentemente, con questa scelta si è rinunciato a mimare direttamente l'effetto della elasticità dei tessuti biologici ma, in compenso, si è ottimizzato l'accesso ottico al sistema. Le componenti elastiche e resistive arteriose sono state tenute in conto mediante il classico modello di Windkessel, consistente nella combinazione di elementi di tipo concentrato (una valvola per la resistenza e un serbatoio parzialmente riempito d'aria per la capacità) a valle della valvola. L'aorta in vetro è stata realizzata usando dati angiografici disponibili in letteratura (11), riguardanti soggetti normali normotesi con diametro della radice aortica pari a 19 mm; sono state quindi riprodotte le particolari strutture anatomiche presenti nella radice aortica (seni di Valsalva), mediante delle epitrocoidi a 120°, dove il flusso può avere caratteristiche vorticose, nettamente distinte dal flusso principale. Una veduta d'insieme del duplicatore d'impulsi dell'Università di Sheffield è fornita dalla Figura 3.

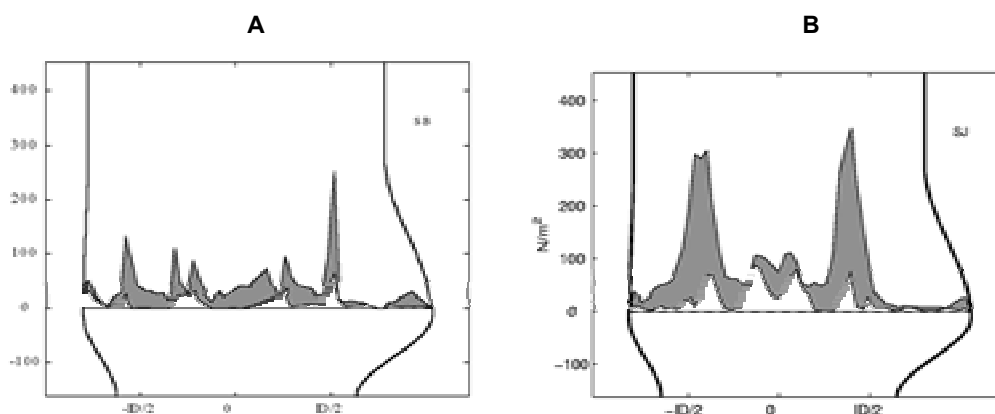


Figura 3. A: profilo dello sforzo di taglio da turbolenza, a 7 mm a valle della valvola Sorin Bicarbon (19 mm). B: profilo dello sforzo di taglio da turbolenza, a 7 mm a valle della valvola St. Jude Standard (19 mm). (grigio) TSS_{max} ; (bianco) TSS misurato nel sistema di coordinate di misura. Flusso sanguigno dal basso verso l'alto

Per ottenere delle misure significative, il flusso in entrata alla valvola deve essere il più possibile uniforme, e non introdurre turbolenza. Per ottenere questo risultato nello spazio

ristretto a disposizione si è adoperata una griglia di tubi di piccola sezione, nei quali l'effetto della viscosità nello smorzamento della turbolenza è massimizzato e, a valle, una geometria di imbocco a sezione variabile, che accelera il flusso producendo così un flusso *plug*, cioè con profilo di velocità tendenzialmente piatto.

Come sopra ricordato, l'aorta in vetro soffiato è stata realizzata utilizzando dati angiografici, per cui le misure sono state realizzate in condizioni di similitudine geometrica rispetto a un flusso aortico *in vivo*. Inoltre, il fluido circolante nel sistema, oltre ad avere lo stesso indice di rifrazione ($n=1,47$) del vetro (in modo da minimizzare l'effetto delle rifrazioni dei fasci laser all'interfaccia vetro-fluido), aveva una viscosità cinematica di 3,7 cSt che è tipicamente quella del sangue. Si è così realizzata anche la condizione di similitudine cinematica, per cui i risultati presentati sono direttamente valutabili, senza dover effettuare scalature tramite i parametri di similitudine.

Il problema del campionamento

Un aspetto frequentemente sottovalutato nelle misure velocimetriche di protesi valvolari consiste nel legame fra intervallo temporale medio di campionamento e caratteristiche statistiche del campo di velocità. Infatti, è opportuno avere campioni statisticamente indipendenti. Per verificare l'ipotesi di indipendenza statistica dei campioni di velocità, occorre stimare quella che in fluidodinamica è chiamata scala integrale temporale:

$$T = \int_0^{\infty} \rho(\tau) d\tau$$

dove $\rho(\tau) = \overline{u(t)u(t')}/u^2$ (è la funzione normalizzata di autocorrelazione), che costituisce un riferimento per il minimo intervallo di tempo fra campioni di velocità considerabili statisticamente scorrelati (12, 13).

Per ogni punto della griglia sono stati raccolti circa 1200 campioni di velocità; per questo valore, nel caso di intensità relativa di turbolenza (valore quadratico medio della fluttuazione diviso per la velocità media) del 100% (valore tipicamente raggiunto nel caso di una valvola solo quando la velocità media diventa molto piccola), si ha una deviazione standard dell'errore relativo nella misura della velocità media inferiore al 3%.

Determinazione dei massimi sforzi normali e tangenziali agenti in un punto di un campo di flusso turbolento

Questi sforzi, come sopra accennato, hanno particolare interesse nel caso del campo di flusso relativo a valvole cardiache artificiali a causa del possibile danno ematico da essi prodotto.

Lo sforzo di taglio $\overline{\rho u_i u_j}$ (u_i , u_j : fluttuazioni istantanee nelle direzioni ortogonali i e j), che agisce in direzione i (j) su una superficie la cui normale è orientata come j (i), dipende per definizione dall'orientazione degli assi del sistema di riferimento usato nelle misure. Pertanto, è necessario valutare come $\overline{\rho u_i u_j}$ varia per ogni possibile scelta del sistema di riferimento.

Un'analisi completa della variazione di tali sforzi al variare della direzione della normale alla superficie comporta la diagonalizzazione del tensore τ , cioè l'individuazione del sistema di riferimento nel quale il tensore ha la forma

$$\tau = \begin{pmatrix} \sigma_1 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_2 & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_3 \end{pmatrix}$$

dove gli elementi diagonali sono i cosiddetti stress normali principali (SNP). Se, ad esempio, $\sigma_1 > \sigma_2 > \sigma_3$, il massimo (minimo) sforzo normale al variare della direzione di n (normale alla

superficie) è σ_1 (σ_3). Inoltre, il massimo sforzo di taglio misurabile è dato da $\frac{\sigma_1 - \sigma_3}{2}$ (14).

In un sistema di misura bidimensionale, non si può misurare direttamente tutto il tensore di Reynolds, ma solo tre delle sue componenti (una sottomatrice 2*2 di τ), quindi questa tecnica sarebbe inapplicabile. Si può, nondimeno, calcolare il massimo sforzo di taglio $\rho u_i u_j$ al ruotare del sistema di coordinate nel piano (i,j) in particolari casi di flusso bidimensionale, scegliendo opportunamente le componenti da misurare. Il massimo valore così ottenuto, infatti, sarà

generalmente minore del valore massimo teoricamente misurabile, $\frac{\sigma_1 - \sigma_3}{2}$. Tuttavia, nel caso delle valvole qui considerate, del tipo a doppia flangia, l'approssimazione bidimensionale al problema dell'individuazione del massimo TSS (*turbulent shear stress*) risulta soddisfacente, quando le componenti misurate siano quella assiale e quella verticale (15). Infatti, si può ritenere che le fluttuazioni di velocità $\overline{u^2}$ siano più forti in direzione assiale, per cui la direzione del massimo sforzo normale ($\sigma_1 = \rho \overline{u_{\max}^2}$) e quella assiale sono approssimativamente parallele. In direzione verticale, all'opposto, si hanno per valvole a doppia flangia le fluttuazioni meno violente, per cui tale direzione sarà all'incirca quella dove lo sforzo normale è uguale a σ_3 , cioè il minimo. La valutazione del massimo sforzo di taglio nel detto piano di misura condurrà a un

valore non molto diverso da $\frac{\sigma_1 - \sigma_3}{2}$, tenuto conto del fatto che dall'analisi bidimensionale si ha che il massimo sforzo di taglio nel piano (i,j) è sempre uguale alla semidifferenza del massimo e del minimo (sempre in relazione al suddetto piano) sforzo normale.

Quanto sopra è confermato da un'analisi con la tecnica LDA 3D (15), che mostra come il massimo sforzo di taglio, calcolato con l'approssimazione bidimensionale nel piano suddetto, sia quasi coincidente con il massimo 3D, almeno per il profilo perpendicolare ai leaflets (quello al quale si riferiscono i risultati seguenti).

Confronto fra il TSS e il TSS_{max}

La misura di $\overline{\rho uv}$ (u, v : fluttuazioni di velocità assiale e verticale), come detto nella precedente sezione, non basta a valutare pienamente la turbolenza prodotta da una protesi valvolare. Si può dimostrare che, detto (x^*, y^*) un sistema di coordinate generico nel piano di misura, ruotato di un angolo α rispetto al sistema (x, y) , il TSS che sarebbe stato misurato nel sistema (x^*, y^*) varia proporzionalmente a $\cos(2\alpha + \theta_0)$, essendo θ_0 esprimibile in funzione dei

risultati della misura nel sistema (x,y) (16). Ciò implica che il TSS si annulla, per certe orientazioni del sistema di misura, indipendentemente da quello che è, in realtà, il suo valore massimo. Pertanto, la semplice misura di $\overline{\rho uv}$ è sicuramente meno significativa del TSS_{max} , che è ricavabile a partire dai dati ottenuti nel sistema di misura (x,y), ed è calcolabile come

$$TSS_{max} = \rho \sqrt{\frac{1}{4}(\overline{v^2} - \overline{u^2})^2 + (\overline{uv})^2}.$$

Nelle Figure 4 e 5 sono riportati i valori del TSS_{max} e, per confronto, del TSS misurato ($\overline{\rho uv}$), per ciascuna delle due valvole considerate (Sorin Bicarbon e St. Jude Standard). È evidente la differenza fra le due quantità, e che solo la prima misura dà conto del massimo carico di taglio che sarà sopportato dalle parti corpuscolate del sangue.

Le valvole a doppia flangia presentano generalmente tre picchi di velocità media in corrispondenza della sistole, a causa della ripartizione del flusso in tre regioni, delimitate dalle flange e dall'anello della valvola (sul quale sono incardinate le flange stesse) (17). I profili del TSS_{max} riportati nelle Figure 4-5 (valori espressi in N/m²) mostrano la presenza di un numero di picchi doppio rispetto al numero di picchi della velocità media: questo è dovuto al fatto che i bordi di un getto sono sede di scambi di energia cinetica con il fluido circostante e, conseguentemente, di un forte TSS. Il fatto che il valore massimo è raggiunto lateralmente, verso il seno di Valsalva per la St Jude Standard e dalla parte opposta per la Sorin Bicarbon, dipende anche dalle condizioni di montaggio e dall'influenza del vortice laterale sul getto vicino.

Il massimo valore del TSS_{max} riscontrato per ciascuna valvola in questo studio risulta dello stesso ordine di grandezza dei valori considerati critici per un possibile danno ai costituenti ematici (200-400 N/m²). D'altronde, come più volte ricordato, le misure erano improntate alla filosofia dell'analisi del caso peggiore, con l'imposizione di un regime difficilmente riscontrabile nelle normali condizioni fisiologiche, per queste valvole di piccolo diametro. I risultati ottenuti devono quindi essere considerati come valori limite della turbolenza prodotta da protesi valvolari di piccola taglia. Ancora, è l'effetto combinato del valore del TSS istantaneo e del tempo di esposizione a produrre emolisi, quindi a queste misure va associato il tempo di passaggio di un eritrocita nella zona ad alta turbolenza (tempo che si può stimare in pochi millisecondi).

Cenni sulla tecnica *Particle Image Velocimetry* e il *tracking*

La *Particle Image Velocimetry* (PIV) è una tecnica sperimentale di misura del campo di moto di un fluido. Essa si basa sull'utilizzo di telecamere ad alta risoluzione per l'acquisizione di immagini del campo di misura, previamente illuminato da una fonte di luce coerente, come la luce laser.

La stima delle velocità del fluido discende dalla capacità di particelle "inseminanti" di trasmettere la luce da cui sono investite quando attraversino la sezione di misura. La scelta delle particelle deve essere compiuta opportunamente, tenendo conto dei fenomeni fisici coinvolti nell'esperimento da condurre.

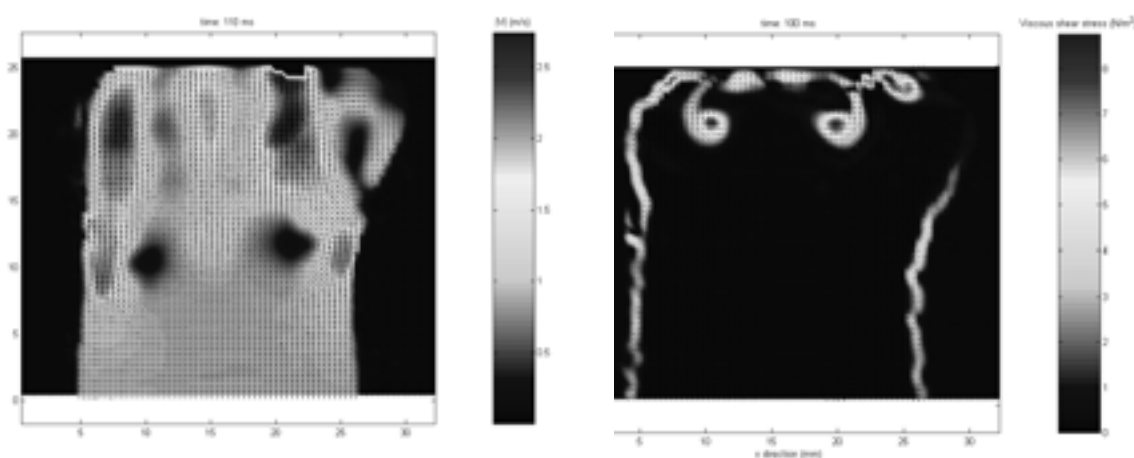
La sequenza di immagini acquisite nel tempo è analizzata da algoritmi computerizzati che effettuano, su coppie di immagini (singola esposizione) o su immagini singole (multiesposizione) temporalmente successive, un'operazione di correlazione (*cross* o *auto*-

correlazione), al fine di individuare lo spostamento delle particelle insemi nanti tra gli istanti di tempo acquisiti. La relazione fra tempo trascorso e spazio percorso è la velocità.

Assieme alle velocità si è in grado di determinare i gradienti spaziali e temporali delle stesse, utili nello studio delle sollecitazioni agenti su volumi di fluido interessati dagli spostamenti. Nel caso delle valvole cardiache meccaniche tali sforzi possono in qualche modo essere messi in relazione con la capacità dei corpuscoli sanguigni di sopportarli nel tempo, senza danneggiarsi.

Particolarmente importante, a questo proposito, sono i fenomeni turbolenti che possono innescarsi nel fluido in particolari condizioni di velocità o in presenza di particolari geometrie dei condotti.

I fenomeni turbolenti sono responsabili della generazione di sollecitazioni più accentuate di quelle direttamente imputabili alla presenza della viscosità. La Figura 4 mostra i campi vettoriali sovrapposti alle mappe colorimetriche della velocità e dello stress viscoso in due diversi istanti del ciclo.



**Figura 4. Mappe colorimetriche ottenute da misure PIV:
a sinistra è riportata la velocità a destra gli sforzi di taglio**

In secondo luogo sono da tener presenti le storie di sollecitazione dei corpuscoli. Infatti, non solo l'entità delle sollecitazioni, ma anche la loro variabilità temporale contribuisce al danneggiamento.

A tal proposito, assumono notevole importanza i cosiddetti tempi di residenza delle particelle insedianti, citate in precedenza, nelle diverse zone della sezione di prova.

La tecnica velocimetrica – adatta alla determinazione di quest'ultima grandezza e la *Particle Tracking Velocimetry* che, a differenza della precedente, basata su un'analisi di tipo Euleriano – applica un'analisi Lagrangiana al campo di moto, cioè basata sull'"inseguimento" delle particelle insemi nanti, in modo da ricavarne la storia temporale.

Per ogni particella che attraversa la sezione di prova abbiamo, quindi l'informazione sul tempo mediamente trascorso in ogni zona del campo di moto, tanto da poter tracciare una mappa delle zone in cui mediamente le particelle trascorrono più o meno tempo durante l'intervallo di osservazione.

La Figura 5 mostra i tempi di residenza nel periodo immediatamente successivo al picco sistolico.

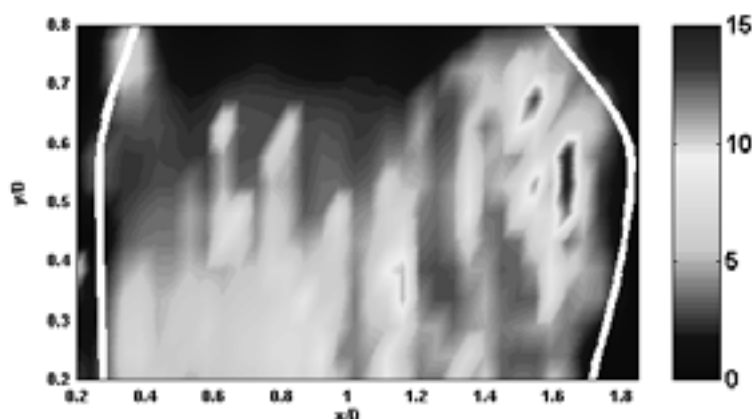


Figura 5. Tempi di residenza (ms) durante la prima fase di decelerazione, dopo il picco sistolico

L'effetto dello sforzo di taglio sulla superficie dell'eritrocita: un nuovo parametro globale

La misurazione del tensore di Reynolds dà una completa caratterizzazione del flusso turbolento prodotto da un dispositivo impiantabile. In particolare, lo sforzo di taglio da turbolenza (TSS, acronimo della dizione inglese *Turbulence Shear Stress*) è stato spesso usato, non correttamente, per quantificare il possibile danno a carico dei costituenti del sangue causato da una valvola cardiaca. Più rigorosamente, occorre usare a tal fine il valore massimo di tale parametro, al variare dell'orientazione del sistema di coordinate associato alla sua misura: tale parametro, il TSS_{max} (massimo sforzo di taglio da turbolenza) è derivabile dal tensore di Reynolds può associato a un valore di soglia per l'emolisi (valore d'altronde ancora oggetto di discussione e rivalutazione), ed è espresso come:

$$TSS_{max} = (\sigma_1 - \sigma_3)/2,$$

dove σ_1 e σ_3 rappresentano il maggiore e minore sforzo normale principale (PNS), rispettivamente, in ogni punto del flusso.

Recentemente (18) è stato proposto un nuovo parametro, consistente nel valore medio dello sforzo di taglio, causato dal flusso turbolento, sulla superficie di un costituente ematico. Nel caso particolare di una superficie sferica, per cui si ha una soluzione esatta al problema della determinazione di tale parametro, si è dimostrato come tutti e tre i PNS (σ_1 , σ_2 e σ_3) hanno un uguale ruolo nella formula per il valore medio superficiale dello sforzo di taglio, diversamente dal caso della formula del TSS_{max} , precedentemente considerata. In Figura 6 si ha una mappa in scala di grigi dello sforzo di taglio TSS su una superficie sferica; da questa distribuzione si calcola (analiticamente o numericamente) il valore medio superficiale del TSS.

Si può supporre che questo parametro abbia importanza nel meccanismo di attivazione piastrinica. Infatti, è probabile che il primo stadio dell'attivazione delle piastrine avvenga tramite la glicoproteina di membrana GPIb alpha (19). In quanto recettore del fattore di von Willebrand (vWF), GPIb ha un ruolo importante nell'adesione piastrinica al subendotelio. A causa del numero non trascurabile di tali recettori (oltre 25000 copie) sulla superficie piastrinica (20), è facile rendersi conto che ognuno di tali recettori sarà soggetto a un differente livello di

sforzo di taglio, determinato dalla propria orientazione sulla superficie e dall'espressione del tensore di Reynolds. L'effetto globale di tale distribuzione di sforzi dipenderà dal livello medio di sforzo di taglio, per cui il parametro proposto è fisicamente significativo.

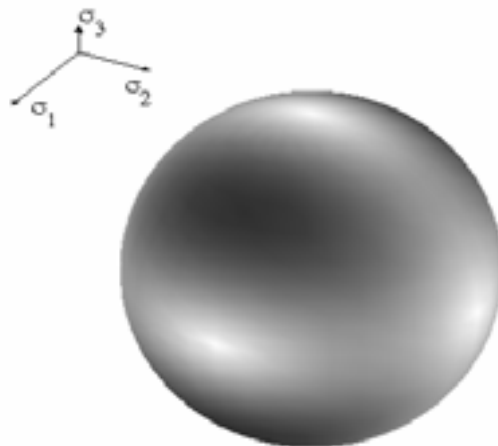


Figura 6. Mappa colorimetrica degli sforzi di taglio su una superficie sferica (il colore più chiaro corrisponde al valore nullo, quello più scuro al valore massimo, cioè al TSS_{max})

Un aspetto interessante di questa analisi è che, a parità di TSS_{max} , ci possono essere variazioni notevoli nel valore medio sulla superficie del TSS, dal momento che anche il PNS intermedio, σ_2 , contribuisce a quest'ultimo, mentre non ha influenza sul TSS_{max} . Si è quindi indentificata la potenziale importanza del PNS intermedio, σ_2 , precedentemente del tutto trascurato nella valutazione degli effetti fluidodinamici sul sangue. Ulteriori studi sono in corso per generalizzare il risultato a differenti geometrie del modello di costituente ematico, svincolandosi dall'ipotesi di sfericità, come in Figura 6 (anche se interessante di per sé, ad esempio per le applicazioni a particolari patologie che implicano mutazioni morfologiche dei globuli rossi).

Conclusioni

In questo lavoro sono stati presentati alcuni risultati di uno studio effettuato su protesi valvolari meccaniche in condizioni limite, al fine di esemplificare le metodiche usate per quantificare quello che presumibilmente è il carico meccanico esercitato sui costituenti ematici durante il loro passaggio attraverso una protesi.

Sono stati calcolati i valori del massimo sforzo di taglio indotto dalla turbolenza (TSS_{max}), secondo l'analisi bidimensionale degli sforzi principali, minima consentita nel caso delle tecniche anemometriche. I valori trovati ricadono nella zona degli sforzi di taglio che possono causare un danno ai costituenti del sangue. Va tuttavia considerato che le condizioni alle quali sono state sottoposte le protesi valvolari in questo studio sono estreme. Inoltre, si è presentato un metodo basato sulla tecnica PTV che permette di evidenziare l'effetto dose, cioè il tempo durante il quale un eritrocita è soggetto alla sollecitazione meccanica. Questi risultati suggeriscono la necessità di ulteriori studi, per ottenere indici di emolisi che qualifichino in

maniera univoca i possibili danni ematici conseguenti all'impianto di protesi valvolari cardiache, così come altri tipi di protesi che forniscono alterazioni del campo di flusso fisiologico.

A proposito delle tecniche impiegate, va detto che un limite delle tecniche single-point è costituito dalla mancanza di una visione d'insieme del fenomeno fluidodinamico: questo può portare al non riconoscimento di eventuali strutture macroscopiche, come ad esempio grandi vortici trasportati dalla corrente (21). Tali strutture non sono propriamente fenomeni turbolenti, in quanto hanno una larghezza di banda stretta, diversamente dalla turbolenza. Una tecnica complementare alla LDA, in fase di applicazione presso il Laboratorio di Ingegneria Biomedica può essere quindi la PIV, che studia intere sezioni piane di un campo di flusso, e consente di individuare con più facilità le caratteristiche generali del processo studiato, e infine permette di seguire una particella lungo una linea di flusso e fornire indicazioni della dose di stress meccanico che subisce. La tecnica LDA rimane però ineguagliata per quanto riguarda la precisione delle misure, tanto più necessaria quanto è maggiore l'importanza anche sociale dei dispositivi studiati, caratteristica delle valvole cardiache protesiche.

Bibliografia

1. Engbers G H M, Dost L, Hennink W E, Aarts P A, Sixma J J, Feijen J. An *in vitro* study of the adhesion of blood platelets onto vascular catheters. Part I. *J Biomed Mater Res* 1987; 21(5):613-627.
2. Bludszweit C. Three-dimensional numerical prediction of stress loading of blood particles in a centrifugal pump. *Artif Organs* 1995; 19(7): 590-596.
3. Yeleswarapu KK, Antaki JF, Kamenewa MV, Rajagopal KR. A mathematical model for shear – induced hemolysis. *Artif Organs* 1995; 19(7):576-582.
4. Yarborough KA, Mockros LF, Lewis FJ. Hydrodynamic hemolysis in extracorporeal machines. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1966; 52:550-557.
5. Bernstein EF, Indegliia R, Shea M, Varco RL. Sublethal damage to the red blood cell from pumping. *Circulation* 1966; 35-36:1-226.
6. Hall MW, Goodman PD, Solen KA, Mohammad SF. Formation of occlusive platelet aggregates in whole blood caused by low concentrations of ADP. *ASAIO J* 2000; 46(6):693-695.
7. Sallam AM e Hwang NHC: Human red blood cell hemolysis in a turbulent shear flow: contribution of Reynolds shear stresses. *Biorheology* 1984; 21: 783-797.
8. Adrian RJ: Laser Velocimetry. In: Goldstein RJ (Ed): *Fluid Mechanics Measurements*. Hemisphere Publishing Corporation; 1983.
9. Nygaard H, Giersiepen M, Hasenkam JM, Westphal D, Paulsen PK e Reul H: Estimation of turbulent shear stresses in pulsatile flow immediately downstream of two artificial aortic valves *in vitro*. *J Biomech* 1990; 23: 1231-1238.
10. *Draft Replacement Heart Valve Guidance*. Food and Drug Administration; October, 1994
11. Reul H, Vahlbruck A, Giersiepen M, Schmitz-Rode TH, Hirtz V e Effert S. The geometry of the aortic root in health, at valve disease and after valve replacement. *J. Biomech* 1990; 23:181-191.
12. Hinze JO. *Turbulence*. McGraw-Hill; 1975.
13. Tennekes H, Lumley JL. *A first course in turbulence*. The MIT Press; 1972.
14. Malvern L.E. *Introduction to the mechanics of a continuous medium*. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs; 1977.

15. Fontaine AA, Ellis JT, Healy TM, Hopmeyer J e Yoganathan AP. Identification of peak stresses in cardiac prostheses. A comparison of two-dimensional *versus* three-dimensional principal stress analyses. *ASAIO J* 1996; 42:154-163.
16. Barbaro V, Grigioni M, Daniele C e D'Avenio G: Principal stress analysis in LDA measurements of the flow field downstream of 19-mm Sorin Bicarbon prosthetic heart valve. *Technology and Health Care* 1998; 6 (4): 259-270.
17. Barbaro V, Grigioni M, Daniele C, D'Avenio G e Boccanera G: 19 mm sized bileaflet valve prostheses' flow field investigated by bidimensional laser Doppler anemometry (part I: velocity profiles). *Int. J. Artif. Organs* 1997 ; 20:622-628.
18. Grigioni M, Daniele C, D'Avenio G, Barbaro V. Evaluation of the surface-averaged load exerted on a blood element by the Reynolds shear stress field provided by artificial cardiovascular devices. *J Biomech* 2002; 35(12):1613-1622.
19. Goto S, Salomon DR, Ikeda Y, Ruggeri ZM. Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. *J Biol Chem* 1995; 270(40):23352-23361.
20. Jandrot-Perrus M, Bouton MC, Lanza F, Guillin MC. Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Ib. *Semin Thromb Hemost* 1996; 22(2):151-156.
21. Lieber BB: The decomposition of apparent stresses in disturbed pulsatile flow in the presence of large scale organized structures. *J Biomech* 1990; 23 (10): 1047-1060.

BIOREOLOGIA: MODELLI DI COMPORTAMENTO E METODI SPERIMENTALI

Bruno de Cindio

Dipartimento di Ingegneria Chimica e dei Materiali, Università della Calabria, Rende (CS)

Introduzione

Classicamente il comportamento reologico di un materiale è determinato imponendo una sollecitazione esterna che può essere una trazione o compressione e quindi una forza, oppure si può imporre un flusso e quindi una portata. La risposta del materiale a queste due sollecitazioni è quindi collegata al loro comportamento nel senso che nel primo caso si misura il modulo meccanico di un solido, mentre invece nel secondo caso si misura la viscosità di un liquido. Si può notare come, in effetti, l'aver scelto una sollecitazione piuttosto che l'altra già ha implicitamente imposto una tipologia di comportamento, perciò l'unica cosa che si fa è valutare l'intensità del parametro materiale definito, sia esso il modulo elastico o la viscosità. Questa è una classica problematica affrontata dalla reologia in quanto, in accordo con Bingham, tale scienza riguarda lo studio della deformazione che subisce un materiale. In effetti, gli sviluppi avutisi finora hanno allargato di molto il campo d'interesse della reologia che quindi viene oggi più propriamente indicata come quella branca della fisica che ha come scopo la descrizione, la spiegazione, la misura e l'applicazione dei fenomeni meccanici che avvengono nei materiali quando questi siano deformati. In questo senso la reologia studia sia la deformazione sia il flusso dei materiali. In generale, lo studio è ridotto, escludendo argomenti quali la teoria dell'elasticità a basse deformazioni, l'idrodinamica classica, l'aerodinamica, ecc., che trovano invece i loro fondamenti come ben definite e sviluppate branche della fisica. Pertanto i reologi hanno in particolare confinato la loro attenzione allo studio del comportamento di quei materiali che a causa della loro specifica natura o a causa delle relativamente grandi deformazioni cui sono sottoposti, non obbediscono a leggi semplici che legano lo sforzo alla deformazione, quali ad esempio la legge di Hooke per l'elasticità o la legge di Newton per la viscosità. In pratica queste due leggi sono considerate come casi limite di un più generale comportamento. È questo indubbiamente il caso dei fluidi biologici.

In generale l'obiettivo primario dello studio reologico di un materiale è la ricerca di una relazione che ne definisca il comportamento meccanico e quindi il legame tra sforzo e deformazione. Questa relazione, che definisce i parametri e le funzioni materiali caratteristici del sistema considerato, è usualmente indicata con il nome d'equazione costitutiva od anche equazione reologica di stato del materiale. Una volta che sia stata ottenuta questa legge, essa può essere inserita nei relativi bilanci di quantità di moto, d'energia e di materia allo scopo di risolvere specifici problemi. In particolare l'equazione costitutiva entra direttamente come sforzo nel *II Principio della Dinamica* e indirettamente nel *I Principio della Termodinamica* come potenza di deformazione. L'equazione costitutiva deve rispondere ad alcuni requisiti specifici. In particolare ad essa è richiesta una sufficiente generalità e quindi un riferimento a classi di materiali più che ad un singolo materiale, inoltre si dovrebbe scrivere una espressione tridimensionale e non monodimensionale.

La determinazione dei parametri materiali è cosa relativamente facile solo per alcuni sistemi. Si tratta in pratica di stabilire un certo programma sperimentale che consenta di verificare assunte ipotesi costitutive: il campo di deformazioni imposto è in generale controllato e quindi

noto a priori. Questa branca della reologia è detta reometria e rappresenta lo strumento di misura di quelle proprietà che definiscono il comportamento del materiale. Se quest'ultimo è reologicamente complesso, possono sorgere notevoli difficoltà sia di carattere sperimentale sia d'interpretazione dei dati.

Per quanto riguarda l'utilizzo delle equazioni costitutive trovate, si affrontano problemi dove la difficoltà maggiore consiste nel non conoscere il campo di deformazione applicato che invece deve essere calcolato. Pertanto metodi di calcolo più o meno sofisticati, tecniche di modellazione e di simulazione del processo, sono necessari per raggiungere in alcuni casi l'obiettivo proposto. Nel caso di comportamento tendenzialmente da liquido, si tratta in pratica di calcolare la fluidodinamica che si realizza per date condizioni al contorno.

Per concludere sembra opportuno ricordare che i grandi sviluppi avutisi più o meno recentemente, sono essenzialmente legati allo sviluppo dei polimeri. Infatti, i materiali plastici, attualmente largamente usati, propongono e hanno proposto notevoli difficoltà di comprensione e caratterizzazione proprio perché meno facilmente classificabili dal punto di vista del comportamento, come invece accade per i materiali tradizionali quali acciaio, acqua, ecc. L'inadeguatezza sia sperimentale sia teorica inizialmente esistente e le necessità di sviluppo legate al sempre maggiore utilizzo della plastica, sono stati fattori trainanti per lo sviluppo della reologia in questo settore, che ha portato non solo alle attuali tecniche reometriche, ma anche a notevoli risvolti di reologia teorica, per cui oggi si può parlare in generale di reologia dei materiali. I risultati ottenuti sono ben consolidati e possono ora essere promettentemente traslati in altri settori, come ad esempio il settore dei prodotti alimentari, dei detersivi, dei prodotti farmaceutici, dei liquidi fisiologici, in cui l'uso della reologia, seppure da sempre auspicato, è stato poco considerato sulla base di inerenti e spesso insormontabili difficoltà. È ben riconosciuto attualmente che la reologia può dare in questi settori un contributo decisivo per una maggiore comprensione scientifica e per un'immediata applicazione pratica sullo studio e nella realizzazione sia dei processi che dei prodotti.

In particolare nel campo dell'emoreologia, o più in generale della bioreologia si è visto che in passato gli studi, anche per la mancanza d'apparecchiature specifiche, sono stati diretti a sviluppare metodiche diagnostiche con risultati spesso modesti, essenzialmente a causa delle sopra accennate carenze sperimentali. Pertanto ai primi ottimismo è succeduto un certo pessimismo sulla validità d'applicazione di queste tecniche, specialmente nel caso del sangue. Le cose sono cambiate in particolare nello specifico campo dell'ematologia, allorquando ci si è resi conto che, al posto di puntare esclusivamente sul tentativo di eseguire misure sul sangue in toto, si poteva invece effettuare una suddivisione in emazie e plasma e studiarne il comportamento reologico separatamente. La sperimentazione si semplifica notevolmente e l'utilizzo dei nuovi strumenti reologici disponibili sul mercato, consente di realizzare l'obiettivo di individuare e discriminare stati patologici, e quindi la reologia può di nuovo affiancarsi con successo alle attuali tecniche diagnostiche. Resta infine da notare che un valido contributo può essere dato nella caratterizzazione di fluidi fisiologici in condizioni in flusso, rendendo possibile simulare le condizioni di flusso che avvengono nei condotti e le eventuali variazioni che si possono indurre nel flusso sanguigno durante stati patologici, mediante aggiunta d'opportuni medicinali.

Si può concludere che la strada da percorrere in questo settore è ancora lunga, ma nel futuro si vede una buona e sempre più estesa applicazione della reologia non solo al sangue ma anche ai suoi componenti oltre che una estensione a diversi liquidi biologici.

Il numero di Deborah

Se si resta ancorati alla definizione letteraria di reologia, vale a dire come la scienza dei materiali che scorrono, immediatamente sorgono alcune questioni come: cosa s'intende effettivamente per fluire? Quale è la differenza tra liquidi e solidi? Classicamente si considera solido un materiale che ha forma e volume propri, mentre per liquido s'intende un materiale che ha solo volume proprio, assumendo la forma del recipiente che lo contiene. Questa definizione appare molto restrittiva se si osserva ciò che capita in natura. Infatti, esclusi fluidi estremamente semplici come l'acqua, molti materiali difficilmente possono essere così decisamente classificati. D'altra parte la stessa acqua se soggetta a condizioni o di sforzo o di deformazione rapidi, si comporta come solido. Basti pensare ad uno schiaffo dato sull'acqua o ad un tuffo da altezza elevata. Ma anche materiali che sembrano normalmente solidi, se osservati su tempi lunghi o processati lentamente, possono evidenziare una certa fluidità. Il recupero nel tempo delle forme originali, è alla base delle distorsioni che si riscontrano dopo qualche tempo nei manufatti plastici. È quindi chiaro che nella definizione di liquido o di solido bisogna immettere la variabile tempo. Pertanto la domanda da porsi è: per quanto tempo l'osservatore deve seguire un fenomeno per dire se il materiale sta scorrendo o no?

Per rispondere a queste domande si può condurre un semplice esperimento che risulta estremamente esplicativo delle situazioni reologiche che possono verificarsi. S'imponga al tempo $t=0$ una deformazione γ a gradino (Figura 1) espressa da:

$$\begin{aligned} \gamma &= 0 & t < 0 \\ \gamma &= \gamma_0 & t \geq 0 \end{aligned} \quad [1]$$

e si registri nel tempo lo sforzo che esibisce il materiale (Figura 2).

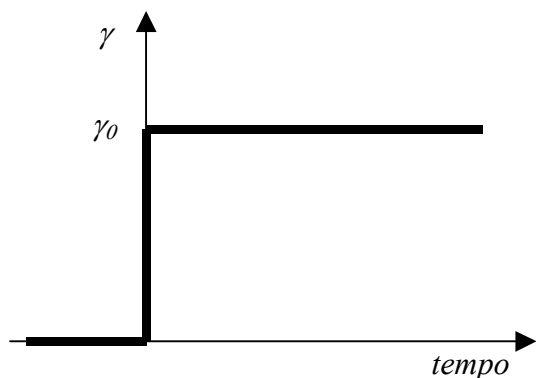


Figura 1. Sollecitazione esterna a taglio

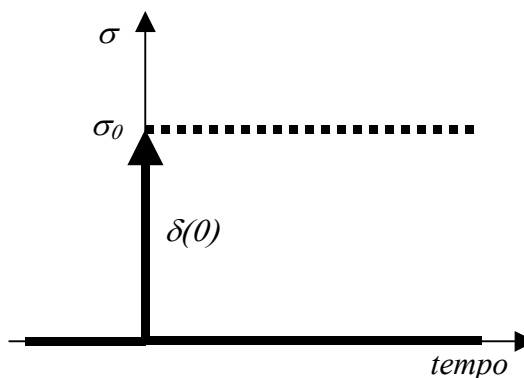


Figura 2. Risposta del materiale a taglio

Si possono avere due risposte estreme e relative alla risposta di materiali che sono classicamente identificati come il solido perfettamente elastico e il liquido newtoniano.

Nel primo caso lo sforzo, funzione della deformazione γ sarà anch'esso una funzione a gradino (curva a puntini di Figura 2), mentre nel secondo caso, poiché la dipendenza funzionale è con $\dot{\gamma}$, si avrà una funzione di Dirac a $t=0$, (curva piena di Figura 2).

Pertanto si può concludere che la risposta del materiale alla sollecitazione imposta è:

$$\begin{aligned}
 \sigma &= 0 & t < 0 \\
 \sigma &= \sigma_0 & t \geq 0 & \text{solido elastico} \\
 \sigma &= \sigma_0 \delta(0) & t \geq 0 & \text{liquido newtoniano}
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

Quanto detto è da un punto di vista fisico in accordo con il concetto che un solido elastico non rilassa mai lo sforzo, mentre un liquido newtoniano lo rilassa completamente e istantaneamente, in altre parole un solido ricorda tutto mentre un liquido dimentica tutto e subito. Si possono avere situazioni intermedie (Figura 3) per le quali o si ha un solido che rilassa parzialmente nel tempo, ovvero un liquido che non rilassa istantaneamente. Il comportamento reologico risultante è quindi complesso e si può parlare in questi casi più propriamente di solidi elasto-viscosi ($\sigma_\infty \neq 0$), o di liquidi viscoelastici ($\sigma_\infty = 0$). In questo modo si è introdotto nel comportamento del materiale rispettivamente un certo ammontare di comportamento liquido in un solido o di comportamento solido in un liquido.

Come misura dell'ordine di grandezza del tempo di rilassamento, si può prendere il tempo λ che si ottiene linearizzando la funzione risposta nell'intorno di $t=0$, il che coincide con il considerare il valore della derivata rispetto al tempo calcolata a $t=0$. Spesso si può assumere un decadimento dello sforzo ad esempio di forma esponenziale:

$$\sigma = \sigma_0 \exp\left(-\frac{t}{\lambda}\right) \tag{3}$$

il significato fisico essendo quello di una memoria evanescente dello sforzo da parte del materiale. Espandendo in serie l'equazione 3 intorno a $t=0$, e limitandosi a considerare solo il primo termine si ha:

$$\sigma = \sigma_0 \left(1 - \frac{t}{\lambda}\right) \tag{4}$$

L'intercetta della pendenza sull'asse t rappresenta proprio il cosiddetto tempo di rilassamento λ , così come mostrato in Figura 4.

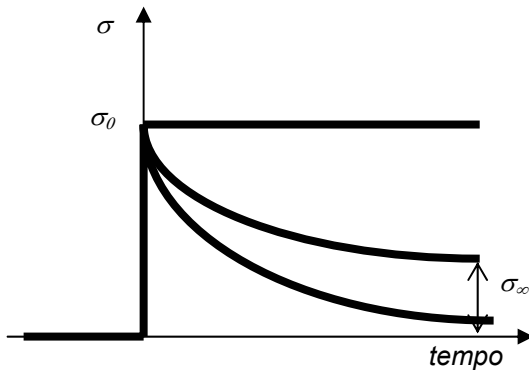


Figura 3. Diverse forme di risposta

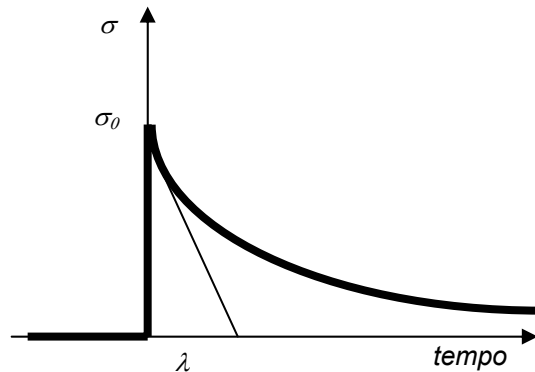


Figura 4. Il tempo di rilassamento

Per classificare il comportamento dei materiali ci si può quindi riferire ad un numero adimensionale, chiamato “numero di Deborah”, definito come il rapporto tra due tempi caratteristici, il tempo di rilassamento del materiale e il tempo d'osservazione o di processo:

$$De = \frac{\lambda}{t_f} \quad [5]$$

In questa maniera si confronta una proprietà intrinseca del materiale ad una possibilità di investigazione dello stesso. Quest'ultima è legata all'uso e allo strumento di misura utilizzato, ma t_f può essere anche inteso più in generale come il tempo caratteristico del processo cui è sottoposto il materiale considerato, sia esso uno strumento di misura che un vero e proprio processo di trasformazione. In questo senso si afferma che il tempo di osservazione t_f è il tempo misurato seguendo una particella del materiale e richiesto per rilevare una variazione non trascurabile nelle condizioni cinematiche.

La definizione di liquido designa classicamente come liquido un materiale che si deforma irreversibilmente quando è soggetto ad un campo di forze. Ma è indubbiamente noto che anche i metalli, generalmente considerati solidi, si deformano irreversibilmente quando la forza applicata raggiunge una certa grandezza ed è applicata per un certo tempo. Gli strutturisti sono ben consci dei problemi relativi allo scorrimento nei solidi. D'altro canto si può invertire il ragionamento e concludere che anche i liquidi non dissipano necessariamente tutta l'energia di deformazione, ma parte di essa risulta recuperabile. Questo ultimo aspetto è tipico di un solido. Si può quindi concludere rispondendo alle domande poste inizialmente, affermando che non esiste una reale distinzione tra liquido e solido in termini di proprietà caratteristica di una sostanza, ma la distinzione sta nella risposta meccanica transitori ad un certo campo di deformazione. Poiché tale risposta è condizionata dal tempo d'osservazione, fluire significa esibire un cambio di forma in un certo tempo, che non dipende esclusivamente dal materiale ma anche dal processo cui esso è sottoposto.

Il numero De può quindi essere indicato a giusta ragione come l'elemento discriminante tra i due opposti, per così dire, comportamenti solido e liquido. In particolare se $De \gg 1$ si avrà o che è molto grande λ (metalli, solidi classici) oppure che t_f è molto piccolo (processi di deformazione istantanei), in entrambi i casi si potrà assumere un comportamento tipo-solido. Viceversa se $De \ll 1$ si avrà o che λ è molto piccolo (acqua, liquidi classici) oppure che t_f è molto grande (processi di scorrimento), in tal caso dovrà essere considerato un comportamento tipo liquido. Quando si hanno materiali che prevedono $De \approx 1$, si parla di sistemi complessi e la reologia diventa essenziale per il loro studio fluidodinamico. I fluidi biologici e in particolare il sangue, si presentano molto spesso in queste ultime condizioni e pertanto bisogna considerarne le proprietà solide contemporaneamente a quelle liquide.

Due questioni essenziali sorgono sul come determinare De : come calcolare λ e come calcolare t_f . Per quest'ultimo si deve considerare quale sia la cinematica del processo considerato e generalmente senza molte difficoltà si può valutare una dimensione geometrica e una velocità caratteristica dal cui rapporto ottenere t_f . Le cinematiche più utilizzate sono quella a taglio e quell'elongazionale monodimensionale. La determinazione di λ è invece molto controversa. Con il semplice esperimento del rilassamento si ha solo un'idea sull'ordine di grandezza che può avere λ , in quanto potrebbero esserci diversi valori di λ piuttosto che un unico valore. Infatti un unico valore di λ significherebbe individuare un preciso tempo al quale il comportamento passa da solido a liquido, mentre questo passaggio è fisicamente privo di significato avvenendo piuttosto in maniera continua. Questa indeterminazione può essere superata riferendosi ad un insieme di valori di λ (il cosiddetto spettro dei tempi di rilassamento), come si fa per esempio nel caso dei polimeri, comunque l'uso quantitativo del numero di Deborah è piuttosto problematico.

Principi di reometria

I metodi reometrici sperimentali hanno lo scopo di determinare le proprietà reologiche dei materiali e fanno uso di tecniche che consistono o nell'applicare una deformazione o una velocità di deformazione e misurare lo sforzo, oppure nell'applicare uno sforzo ai contorni solidi e misurare la deformazione.

L'esperimento, che può essere realizzato in condizioni stazionarie oppure transitorie, consiste in linea di principio nell'applicare una storia di deformazione o di sforzi ben definita e pertanto già stabilisce a priori quale debba essere il comportamento meccanico del sistema in esame, ponendosi il problema solo di quantificarlo attraverso il valore dei parametri materiali.

Esiste comunque una possibilità di svincolarsi dalla inerente dipendenza della risposta dalla cinematica imposta, utilizzando le cosiddette cinematiche asintotiche. In pratica si tratta di scegliere un tempo caratteristico di processo in accordo con quanto osservato nel paragrafo precedente. Ne risulta che se si usano flussi lenti (tempi lunghi) si investigano le proprietà liquide, mentre se si applicano deformazioni veloci (tempi brevi) si misurano le proprietà solide. Il caso di proprietà visco-elastiche necessita invece l'uso di oscillazioni di piccola ampiezza.

Nello schema (Figura 5) si fa riferimento anche alle proprietà materiali determinabili mediante semplici ipotesi di linearità del comportamento, che definiscono ben note proprietà dei materiali.

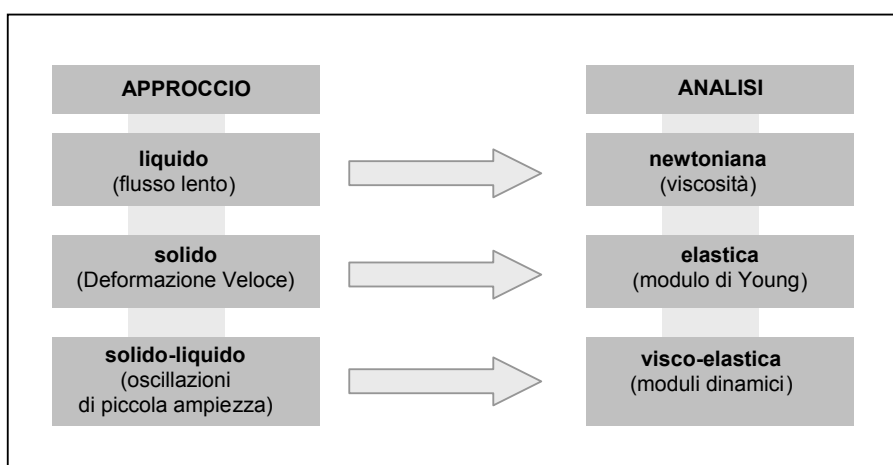


Figura 5. Analisi utilizzate per lo studio delle proprietà dei materiali

Una storia di deformazione molto usata in reometria, è quella dei flussi viscometrici, definiti come quei flussi per i quali la storia di deformazione di ogni singola particella resta costante. Ciò si realizza praticamente ponendo un fluido in flusso tra due piatti paralleli (Figura 6) di cui uno è mantenuto fermo e l'altro è invece dotato di velocità v_0 .

Il flusso che si genera è detto di Couette o di scorrimento a taglio (*shear flow*): in esso è possibile individuare una famiglia di superfici materiali che si mantengono inalterate durante il moto. Tali superfici scorrono l'una sull'altra essendo i piani in moto relativo l'uno rispetto all'altro, inoltre il loro moto è rigido nel senso che due punti, appartenenti alla stessa superficie, si muovono senza peraltro alterare la loro distanza, e quindi senza deformarsi.

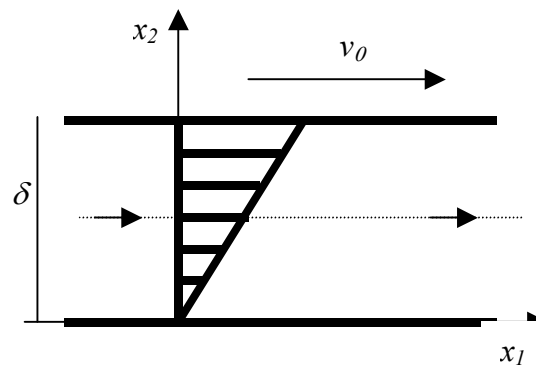


Figura 6. Flusso monodimensionale a taglio

Alla luce di queste ipotesi cinematiche, la velocità di flusso è espressa attraverso il gradiente di velocità, che ha anche il significato specifico di velocità di deformazione a taglio o *shear rate* $\dot{\gamma}$, di conseguenza rappresenta la storia di deformazione, e assume la seguente forma:

$$\frac{v_o}{\delta} = \frac{dv_1}{dx_2} = \dot{\gamma} \quad [6]$$

Questo tipo di flusso può essere realizzato in diverse geometrie e in particolare immettendo il materiale da sperimentare nell'intercapedine tra due cilindri coassiali, oppure tra due piatti paralleli, o anche tra un cono di piccola apertura e un piatto (Figura 7). Mettendo in rotazione una delle superfici solide, il moto realizzato può ritenersi equivalente al flusso di Couette precedentemente descritto, in quanto in tutti i casi descritti si ha una storia di deformazione $\dot{\gamma}$ che si mantiene costante lungo le traiettorie percorse dalle particelle fluide. Peraltro le geometrie citate rappresentano i reometri rotazionali più comunemente utilizzati attualmente.

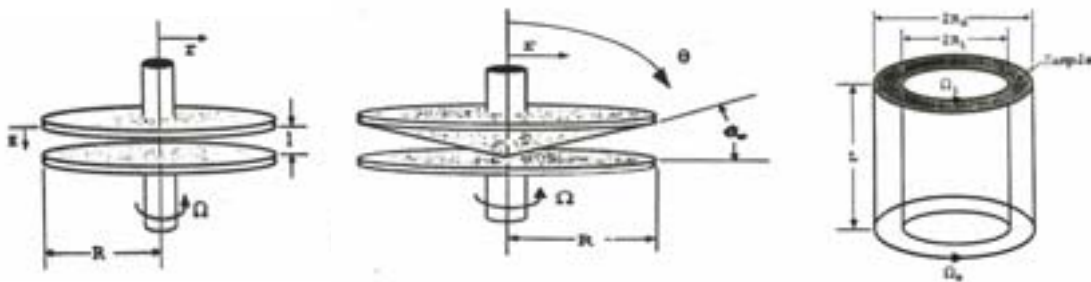


Figura 7. Principali geometrie di misura

Dall'analisi dinamica del fluido in flusso di Couette, risulta che lo sforzo necessaria per mantenere la cinematica imposta, è costituita da quattro componenti τ_{12} , τ_{11} , τ_{22} , τ_{33} . La risposta del materiale alla sollecitazione imposta, è quindi esprimibile come sforzo tangenziale:

$$\tau_{12} = \dot{\gamma} \cdot \eta(\dot{\gamma}) \quad [7]$$

che definisce il coefficiente η (viscosità apparente), come prima differenza degli sforzi normali

$$\tau_{11} - \tau_{22} = \dot{\gamma}^2 N_1(\dot{\gamma}) \quad [8]$$

che definisce il coefficiente N_1 (prima differenza degli sforzi normali), e infine come seconda differenza degli sforzi normali

$$\tau_{22} - \tau_{33} = \dot{\gamma}^2 N_2(\dot{\gamma}) \quad [9]$$

che definisce il coefficiente N_2 (seconda differenza degli sforzi normali). Le tre funzioni materiali η , N_1 , e N_2 definiscono completamente un materiale soggetto ad un flusso a taglio.

Le funzionalità che assumono questi tre parametri definiscono inoltre i diversi modelli reologici proposti per sistemi più o meno complessi come risposta al flusso shear mono-dimensionale. Di seguito si riportano alcuni modelli comunemente usati per rappresentare la risposta di alcuni fluidi semplici:

- Liquido Indipendente dal tempo Newtoniano:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \text{cost.} \quad N_1(\dot{\gamma}) = N_2(\dot{\gamma}) = 0 \quad [10]$$

- Liquido Indipendente dal tempo Newtoniano non Lineare:

$$\eta(\dot{\gamma}) = f(\dot{\gamma}) \quad N_1(\dot{\gamma}) = N_2(\dot{\gamma}) = 0 \quad [11]$$

- Liquido Dipendente dal tempo Viscoelastico Lineare:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \text{cost.} \quad N_1(\dot{\gamma}) = \text{cost.} \quad N_2(\dot{\gamma}) = 0 \quad [12]$$

- Liquido Dipendente dal tempo Viscoelastico non Lineare:

$$\eta(\dot{\gamma}) = f(\dot{\gamma}) \quad N_1(\dot{\gamma}) = f(\dot{\gamma}) \quad N_2(\dot{\gamma}) = 0 \quad [13]$$

$$\eta(\dot{\gamma}) = \text{decreciente} \quad N_1(\dot{\gamma}) = \text{decreciente} \quad N_2(\dot{\gamma}) = 0 \quad [14]$$

Nella Figura 8 sono riportati gli andamenti qualitativi riscontrabili in quest'ultimo caso.

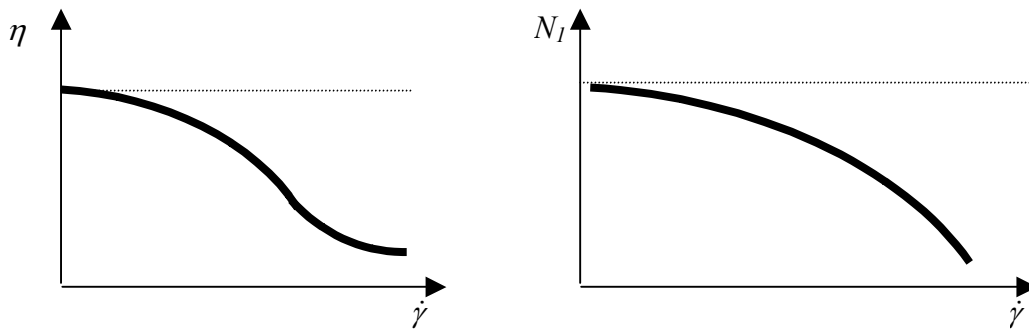


Figura 8. Viscosità apparente e Coefficiente della Prima Differenza degli sforzi normali: caso viscoelastico non lineare

È possibile estendere questi risultati ad altre classi di flussi non viscometrici in cui la storia di deformazione, anche se non coincidente, è solo approssimativamente la stessa. Ciò è particolarmente vero se le differenze riguardano valori molto lontani nel tempo che in accordo con il principio di memoria evanescente, contribuiscono in misura minore alla determinazione dello sforzo attuale. In tal caso si parla di flussi quasi viscometrici. È chiaro comunque che molta cautela va usata nell'applicare queste tecniche di approssimazione, poiché talvolta differenze apparentemente secondarie si rivelano viceversa determinanti.

La strumentazione attualmente disponibile, misura bene gli sforzi tangenziali e con qualche fatica gli sforzi normali, per cui nella pratica ci si limita spesso alla misura del solo sforzo di taglio e quindi la proprietà reologica misurata è la viscosità apparente. In particolare si possono così ottenere delle semplici equazioni costitutive monodimensionali per fluidi indipendenti dal tempo non lineari, e relative ai comportamenti qualitativamente riportati in Figura 9.

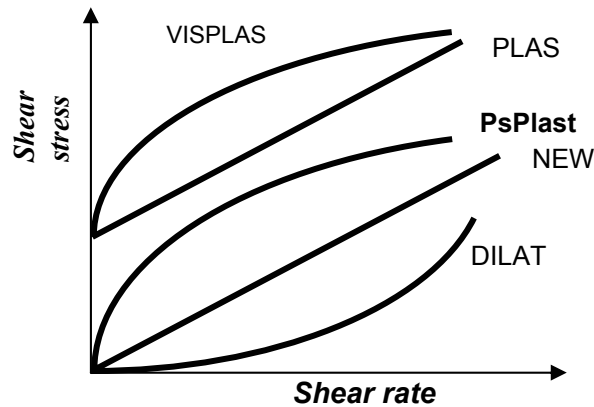


Figura 9. Modelli reologici mono dimensionali

Le corrispondenti equazioni costitutive si identificano nella legge di potenza:

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \quad [15]$$

dove $n < 1$ definisce il fluido pseudoplastico, $n > 1$ quello dilatante, e $n = 1$ il fluido newtoniano. La viscoplasticità è identificata dalla legge di Herschel-Bulkeley:

$$\tau = \tau_y + k\dot{\gamma}^n \quad [16]$$

che degenera nel famoso modello di Bingham per $n=1$. Infine spesso si utilizza anche il cosiddetto modello di Casson:

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_y} + k\sqrt{\dot{\gamma}} \quad [17]$$

Nel caso delle cinematiche asintotiche si utilizzano spesso le stesse celle di misura almeno per quanto riguarda sistemi tipo liquidi. Nel caso dei citati flussi lenti, dato un moto con una qualunque assegnata storia di deformazione $\underline{E}_t(t')$, si considerano i cosiddetti moti ritardati la cui storia è definita come:

$$\bar{\underline{F}}_t(t') = \underline{F}_t[t - \beta(t - t')] \quad [18]$$

dove β varia tra 0 e 1. Il senso di questa equazione consiste nel considerare nella nuova storia, deformazioni uguali all'originaria, ma diluite nel tempo. Il rallentamento è tanto maggiore

quanto più piccolo è β , arrivando alle condizioni di riposo per $\beta \approx 0$. Applicando questa ipotesi asintotica ad un fluido semplice, si ottiene una espressione del tipo

$$\underline{\tau}_t = 2\mu \underline{D}_t + \dots \quad [19]$$

dove il gradiente di velocità $\underline{D}_t$, che coincide anche con la derivata temporale della deformazione, è valutato all'istante t . Se si considera il solo primo termine si ha il fluido Newtoniano di viscosità μ . Dal punto di vista sperimentale si tratterà di determinare tante funzioni materiali quanti sono i termini considerati. La cinematica asintotica considerata, tende a ritenere il materiale un liquido, e in questo senso si scelgono condizioni cinematiche che esaltino proprio questo comportamento. Nel caso di flusso shear monodimensionale la proprietà materiale misurata è la viscosità zero-shear che rappresenta l'asintoto della viscosità apparente come riportato in Figura 9.

Un'altra possibilità di cinematica asintotica ampiamente usata, fa uso dell'ipotesi che il fluido durante il suo moto o la sua deformazione, assuma configurazioni poco diverse l'una dalla altra. Pertanto se si assume una forma funzionale della deformazione in shear di tipo sinusoidale (Figura 10):

$$\gamma(\omega, t) = \gamma_o \sin \omega t \quad [20]$$

in cui la dipendenza dal tempo avviene direttamente attraverso il prodotto ωt , e non separatamente.

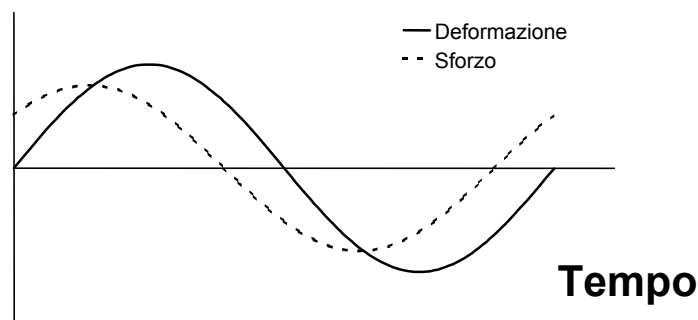


Figura 10. Misure in oscillatorio

Il materiale risponde alla sollecitazione imposta mediante uno sforzo che, nell'ipotesi di piccole deformazioni, sarà anch'esso sinusoidale, ma sfasato di un certo angolo δ dipendente dal suo caratteristico comportamento reologico. Se il materiale fosse un solido perfettamente elastico non si avrebbe sfasamento in quanto sforzo e deformazione sarebbero in fase tra loro per cui $\delta=0$, viceversa se il materiale fosse un liquido newtoniano, lo sforzo dipenderebbe dalla velocità di deformazione ovvero dal coseno, quindi sarebbe sfasato esattamente di $\delta=90^\circ$. In una situazione di comportamento intermedio si avrà in definitiva:

$$\tau(\omega t) = \tau_o \cos(\omega t + \delta) \quad [21]$$

che rappresenta l'unica componente degli sforzi misurata, in quanto nell'ipotesi di oscillazioni di piccola ampiezza i termini normali sono trascurabili. Poiché si tratta in sostanza di una misura di tipo solido, il modulo per comodità può essere scritto come somma di un termine in fase e di uno in quadratura di fase:

$$\tau(\omega t) = \gamma_0 G(\omega t) = \gamma_0 (G'(\omega) \sin \omega t + G''(\omega) \cos \omega t) = G'(\omega) \dot{\gamma} + G''(\omega) \frac{\dot{\gamma}}{\omega} \quad [22]$$

Dalla teoria della viscoelasticità lineare si ha che

$$G(s) = \int_{-\infty}^{\infty} H(\lambda) \exp\left(-\frac{s}{\lambda}\right) d \ln \lambda \quad [23]$$

essendo $H(\lambda)$ lo spettro dei tempi di rilassamento, che rappresenta la distribuzione dei tempi di rilassamento, ovvero dei diversi meccanismi con cui il sistema può rilassare lo sforzo imposto mediante la deformazione. I valori del modulo dissipativo G'' , “*loss modulus*”, e del modulo di accumulo G' , “*storage modulus*”, sono di conseguenza esprimibili come:

$$G''(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} H(\lambda) \frac{\omega \lambda}{1 + \omega^2 \lambda^2} d \ln \lambda = \omega \eta' \quad [24]$$

$$G'(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} H(\lambda) \frac{\omega^2 \lambda^2}{1 + \omega^2 \lambda^2} d \ln \lambda = \omega \eta'' \quad [25]$$

Da un punto di vista fisico, il termine G' dà la parte in fase, ed è per questo è rappresentativo del contributo elastico alla risposta globale, al contrario G'' dà la parte sfasata di 90° , ed è quindi rappresentativo del contributo viscoso. Il metodo è molto interessante, in quanto consente con una unica misura di discriminare tra effetti solidi ed effetti liquidi, consentendo una caratterizzazione viscoelastica in corrispondenza di diversi tempi cambiando la frequenza di oscillazione. Infatti si può assumere che tale tecnica dà la risposta viscoelastica corrispondente ad un tempo $\lambda \approx 1/\omega$.

I tipici andamenti per i fluidi viscoelastici lineari prevedono una risposta del tipo di quella mostrata in Figura 11, dove sono riportati in un diagramma log-log i due moduli dinamici G' e G'' in funzione della frequenza ω .

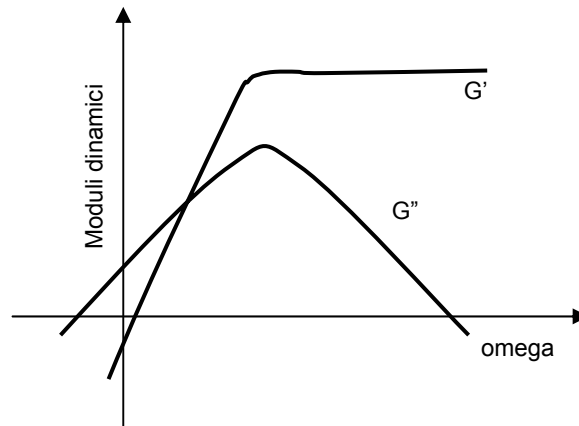


Figura 11. Risposta viscoelastica lineare in *shear* oscillatorio

Alle frequenze basse si ha il comportamento tipicamente da liquido viscoelastico cui corrispondono una viscosità *zero-shear* costante e un coefficiente della prima differenza degli sforzi normali anch'esso costante. Ciò comporta che le pendenze di G' e G'' siano rispettivamente due e uno. Il ginocchio in G'' corrisponde ad un valore della frequenza

approssimativamente pari a $1/\lambda$, in accordo con un numero di Deborah praticamente unitario. Si noti come per frequenze elevate il comportamento tenda a quello di un solido per cui si assiste ad un valore costante del modulo di accumulo, mentre il modulo dissipativi tende a diminuire indefinitamente. Viceversa per frequenze basse il materiale tende ad esibire un comportamento da liquido viscoelastico lineare.

Reometria delle sospensioni

Quando si studiano sistemi contenenti particelle, si fa una distinzione tra interazioni idrodinamiche e interazioni interparticellari. Le prime sono prevalenti per elevate dimensioni delle particelle ($>1\mu m$), mentre le seconde governano il comportamento di particelle estremamente piccole. In ogni caso il comportamento reologico è fortemente condizionato dalla presenza di queste interazioni. Anche se si considerano particelle rigide, grandi e quindi in assenza di interazioni particellari e con il solo contributo dell'interazione idrodinamica, l'aumento della concentrazione porta ad un marcato comportamento non newtoniano che passa attraverso il comportamento pseudoplasico, per poi diventare dilatante e quindi granulo viscoso. La presenza delle interazioni tra le particelle complica notevolmente le cose comportando effetti tempo come la tixotropia. In Figura 12 si mostra il tipo di comportamento del materiale come conseguenza della concentrazione e delle dimensioni particellari. Spesso si fa una distinzione semantica tra sospensioni e dispersioni intendendo per queste ultime sistemi con una fase eterogenea costituita da particelle di dimensioni inferiori al micron.

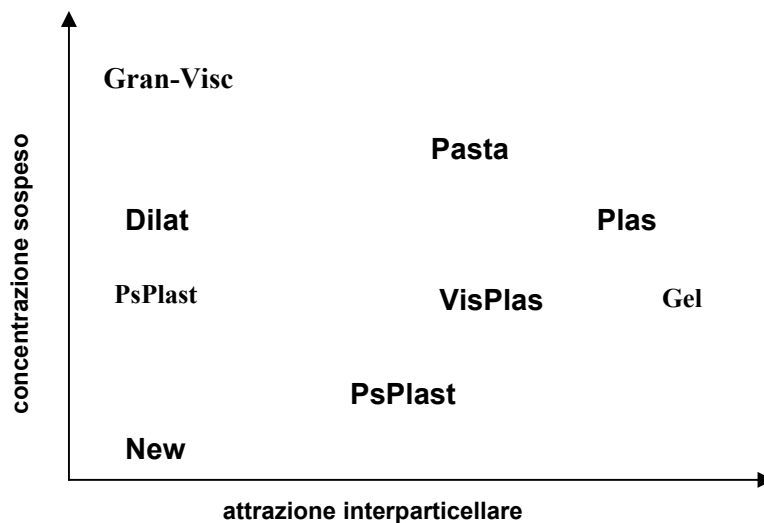


Figura 12. Comportamenti reologici in sistemi eterogenei

Quando si trattano sospensioni o dispersioni, nel caso di flusso a taglio, conviene utilizzare alcune definizioni particolari di viscosità. Trascurando per il momento gli aspetti non-newtoniani, si definisce viscosità relativa il rapporto tra la viscosità della sospensione e quella dell'agente sospendente:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_s} = f(\phi) \quad [26]$$

che nelle ipotesi fatte dipende solo dalla concentrazione volumetrica del sospeso, ed è limitata inferiormente dal valore 1. Per viscosità specifica si intende invece il rapporto tra la differenza delle viscosità della sospensione e del sospendente e di nuovo la viscosità del sospendente

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_s}{\eta_s} = \eta_r - 1 = f(\phi) \quad [27]$$

Con questa scelta è possibile definire la viscosità intrinseca come un fattore che rappresenta l'interazione di una unica particella con il sospendente e che caratterizza la sospensione considerata:

$$\lim_{\phi \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{\phi} = \lim_{\phi \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_s}{\phi \eta_s} = [\eta] \quad [28]$$

Nel caso newtoniano la costanza delle viscosità comporta che le precedenti espressioni siano ben definite e funzioni della sola concentrazione. Viceversa si può presentare una non newtonianità, sia perché il sospendente può essere non newtoniano, sia perché la stessa presenza del sospeso induce un effetto non-newtoniano del tipo descritto nella Figura 12. In particolare si ha:

$$- \text{caso newtoniano} \quad \eta_r = \frac{\eta}{\eta_s} = f(\phi) \quad [29]$$

$$- \text{caso non-newtoniano} \quad \eta_r = \frac{f(\dot{\gamma}, \phi)}{g(\dot{\gamma})} \quad [30]$$

Se si fa riferimento ad un fluido sospendente newtoniano si ha:

$$\eta_r = \frac{f(\dot{\gamma}, \phi)}{\eta_s} \quad [31]$$

Se è possibile trovare una viscosità *zero-shear* allora si avrà:

$$\eta_r^o = \lim_{\dot{\gamma} \rightarrow 0} \frac{f(\dot{\gamma}, \phi)}{\eta_s} = \frac{\eta^o}{\eta_s} = f(\phi) \quad [30]$$

Se invece ciò non è possibile si assisterà ad un'indeterminazione della misura. Appare quindi chiaro che diagrammando la viscosità relativa contro la concentrazione, nel caso newtoniano o non-newtoniano con viscosità zero-shear si ottenga un'unica curva, mentre in quello non newtoniano se ne ottengano una serie a diversi valori di $\dot{\gamma}$. Comunque, ai valori bassi della concentrazione di nuovo si ottiene sempre un'unica curva che spesso può essere correlata mediante l'equazione di Jefferey, che regola le sospensioni diluite di oggetti rigidi in mezzi newtoniani:

$$\eta = \eta_s (1 + \alpha \phi) \quad [31]$$

dove ϕ è la concentrazione volumetrica e $\alpha=2,5$ nel caso di sfere (equazione di Einstein). Si noti che vale anche che $\alpha=[\eta]$ per cui tale valore può essere determinato da misure su sospensioni diluite. Resta da osservare che il vero problema della definizione della viscosità relativa sta nel fatto che aumentando la concentrazione si arriva ad avere interazione tra le particelle stesse, ciò oltre a prevedere difficoltà nell'avere a disposizione una viscosità zero-shear costante, comporta anche un problema di impaccamento delle particelle. Si ha quindi che la curva viscosità concentrazione (Figura 13) laddove sia possibile determinare il valore massimo di

concentrazione ϕ_{max} , corrispondente al massimo impaccamento, deve tendere asintoticamente a tale valore. Questo ultimo è funzione della forma del sospeso, delle sue dimensioni, e della distribuzione delle dimensioni delle particelle. Quindi una correlazione del tipo:

$$\eta_r = \frac{1 + k'\phi + k''\phi^2 + \dots}{1 - \left(\frac{\phi}{\phi_{max}}\right)^\alpha} \quad [32]$$

che prevede un asintoto per $\phi = \phi_{max}$ risulta certamente più idonea della precedente equazione 31.

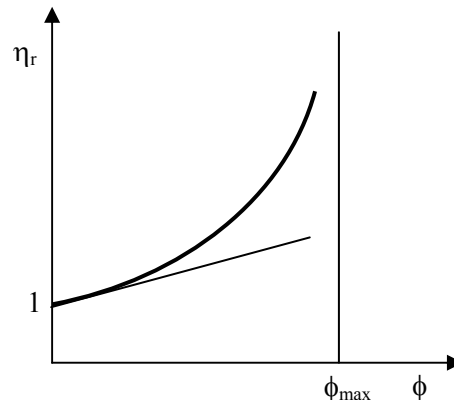


Figura 13. Viscosità relativa in funzione della concentrazione

In letteratura sono state proposte diverse equazioni di questo tipo più o meno ben correlate a dati sperimentali. Se sono presenti anche effetti dispersivi, come nel caso delle particelle di dimensioni piccole, le cose si complicano notevolmente implicando comportamenti come quelli riportati in Figura 12, e quanto finora detto assume maggiormente il senso di un approccio fenomenologico.

Reometria in *shear* di fluidi biologici

Usando l'approccio reologico fin qui descritto e le stesse geometrie indicate nel caso dello *shear*, si possono ottenere dati su fluidi biologici quali il sangue, che prospettano andamenti generali molto simili a quelli fin qui esposti. In particolare, se si considera sangue intero ricostruito variando la percentuale di ematocrito o la concentrazione di fibrinogeno si ottengono andamenti caratteristici come quelli di seguito riportati nelle Figure 14 e 15. Il comportamento in flusso prevede una risposta non newtoniana con una viscosità *zero shear* solo per le concentrazioni più basse in entrambi i casi.

Si può comunque ritenere che il comportamento reologico del sangue intero sia di tipo non newtoniano fino a velocità di taglio intorno a $40-50s^{-1}$, ma aumenta notevolmente al suo diminuire esibendo il classico comportamento pseudoplastico, con possibilità anche di uno sforzo di soglia, peraltro difficilmente rilevabile con una tecnica strani *rate controlled*. Questo comportamento può essere interpretato assumendo che il sangue si comporti come un sistema strutturato debole, per cui all'aumentare della velocità di deformazione, il materiale si destruttura diminuendo così la sua viscosità.

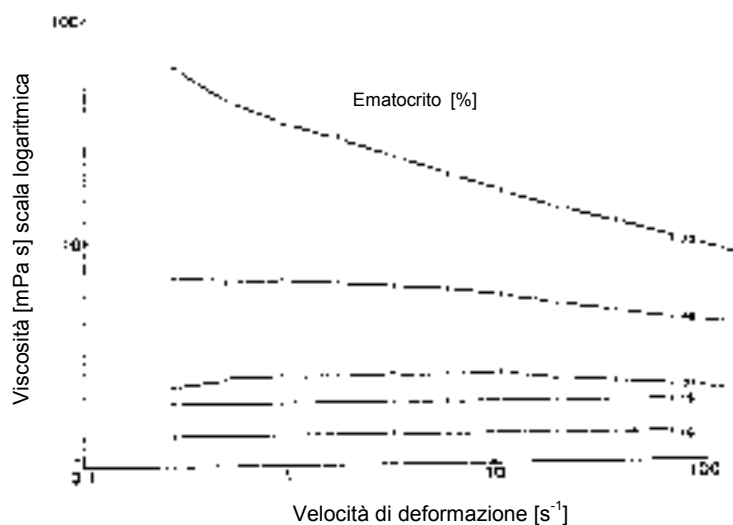


Figura 14. Effetto dell'ematocrito sulla viscosità del sangue



Figura 15. Effetto del fibrinogeno sulla viscosità del sangue

Il comportamento al variare di concentrazione di fibrinogeno è del tutto simile anche se gli effetti non newtoniani risultano maggiormente pronunciati. I dati in flusso stazionario a taglio possono essere riportati come viscosità relativa contro concentrazione. In Figura 16 si evidenzia come la legge di Einstein sia da ritenersi valida solo per valori elevati dello *shear rate*, laddove il materiale tende ad esibire un comportamento newtoniano. Una analoga considerazione difficilmente si riesce ad applicare al caso del fibrinogeno (Figura 17), indicando come non sia possibile considerare questo ultimo semplicemente come un sospeso.

Si può quindi notare come i fluidi biologici presentino una marcata dipendenza sia dalla concentrazione, sia dalla velocità di deformazione, per cui i comportamenti descritti sono da essi ampiamente mostrati.

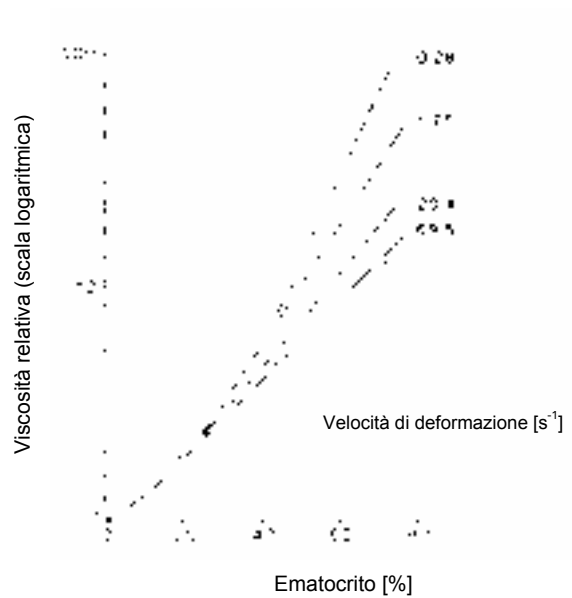


Figura 16. Viscosità relativa del sangue

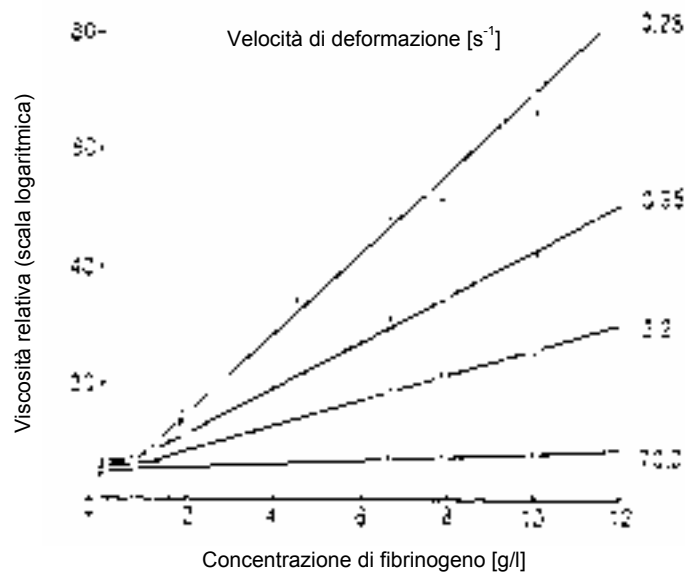


Figura 17. Viscosità relativa del sangue

Molto lavoro è stato svolto da parte di Dintefass e collaboratori giungendo ad equazioni simili a quelle mostrate precedentemente per le sospensioni. In particolare si propone una equazione in cui si ha:

$$\eta_r = \frac{\eta_{sangue}}{\eta_{plasma}} = (1 - HT)^{2.5} \quad [33]$$

dove H è l'ematocrito mentre T è un fattore correttivo detto fattore di Taylor definito empiricamente come

$$T = \frac{\frac{\eta_{int}}{\eta_{plasma}} + 0.4}{\frac{\eta_{int}}{\eta_{plasma}} + 1} \quad [34]$$

Ma si può seguire un approccio semplificato in cui si assume una espressione tipo Jefferey corretta di nuovo per il fattore di Taylor.

$$\eta_r = \frac{\eta_{sangue}}{\eta_{plasma}} = 1 + [\eta] T \phi \quad [35]$$

Usando le stesse geometrie utilizzate per ricavare le curve di flusso, ma sottoponendo il materiale ad una deformazione oscillante è possibile eseguire misure viscoelastiche su fluidi biologici quali il sangue, ottenendosi pertanto curve del modulo elastico G' (Figura 18) e del modulo dissipativo o viscoso G'' (Figura 19) in funzione della frequenza.

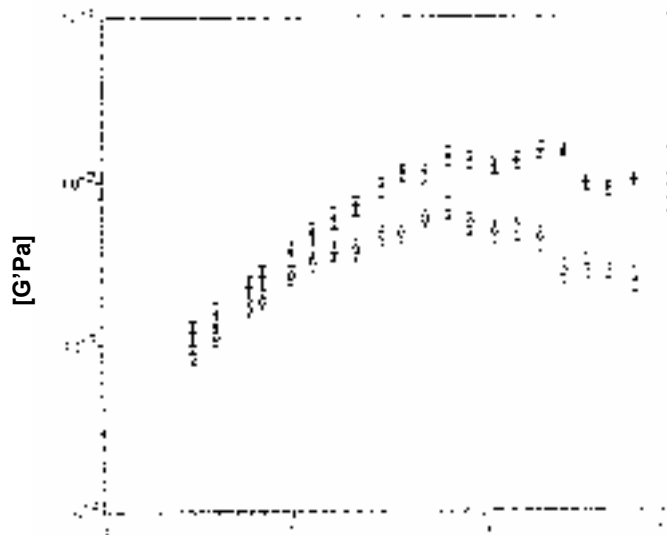


Figura 18. Modulo elastico G' del sangue

In entrambi i casi si riscontra un andamento crescente, con una zona di plateau per il modulo elastico alle velocità angolari più elevate. Il modulo viscoso si presenta prevalentemente lineare con pendenza costante chiaramente indicativa di un comportamento viscoelastico.

La finestra dei tempi non è distante dalla transizione liquido-solido, per cui le proprietà viscoelastiche risultano molto pronunciate. In particolare, si evidenzia che i campioni di sangue ottenuti da soggetti patologici, in particolare affetti da varie patologie oro-maxillo-facciali, presentano sia il modulo elastico sia quello viscoso, più elevati rispetto a quelli dei soggetti normali.

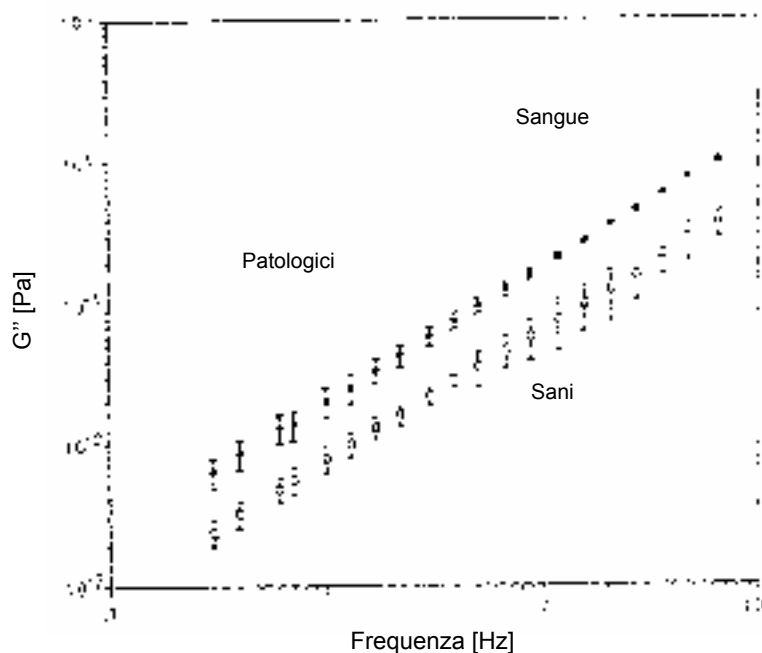


Figura 19. Modulo dissipativo G'' del sangue

Le misure in oscillatorio permettono quindi di stabilire che il sangue ha un comportamento che si modifica al variare della frequenza, evidenziando così una peculiarità comportamento che non è possibile rilevare con le sole misure in flusso a taglio. Inoltre si rileva una buona discriminazione tra soggetti sani e soggetti malati. La stessa tecnica peraltro è applicata con un certo successo anche ad altri fluidi biologici.

La tecnica reometrica CS (*Controlled Stress*)

Si è già discusso precedentemente su cosa significa applicare una velocità di deformazione e misurare uno sforzo, ma l'esperimento citato può essere anche invertito, nel senso che si può applicare uno sforzo costante e vederne la risposta in termini di deformazione (Figura 20).

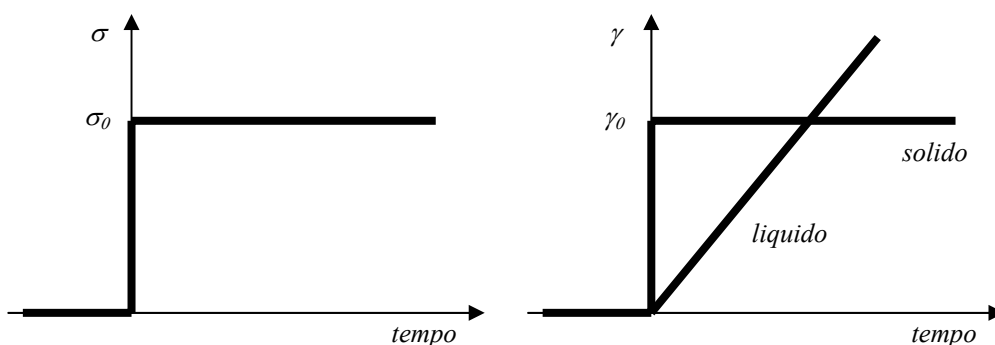


Figura 20. Esperimento di creep

Questa nuova tecnica è stata resa possibile come conseguenza della realizzazione di nuovi motori passo passo, che hanno costituito la base per la costruzione di una nuova generazione di reometri. Occorre subito precisare che questa tecnica sperimentale ha il vantaggio di poter trattare sistemi particolarmente reosensibili, come risultano essere i fluidi biologici e in particolare il sangue e i suoi componenti.

Durante un esperimento di *creep*, un solido perfettamente elastico prevede una deformazione costante essendoci una proporzionalità tra sforzo e deformazione, mentre un liquido newtoniano prevederà una deformazione lineare nel tempo, in quanto la proporzionalità dello sforzo è con la velocità di deformazione.

Un liquido viscoelastico o un solido elastoviscoso prevederanno un certo tempo di ritardo, il primo per arrivare alla proporzionalità, il secondo per arrivare alla costanza della deformazione (Figura 21).

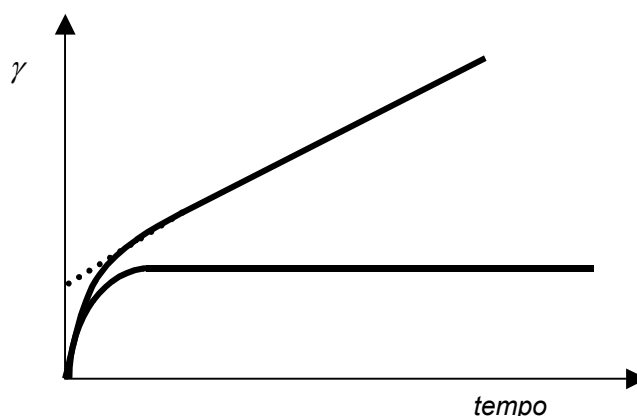


Figura 21. Risposte elasto-viscosa e viscoelastica

In questo caso, pertanto si parla più propriamente di un tempo di ritardo τ caratteristico del materiale considerato. Anche se si dovrebbe considerare meglio un insieme di tempi di ritardo piuttosto che di uno solo.

L'esperimento è inerentemente transitorio per cui possibile separare separare così come fatto per le misure oscillatorie, il contributo elastico da quello viscoso. In particolare se si determina la pendenza della retta ricavabile per tempi lunghi si ricava la viscosità, se invece si estrapola questa retta a zero e si misura ad ogni istante l'area sottesa tra la retta giust'appunto rappresentante il comportamento liquido e la curva effettiva si ottiene il contributo solido della risposta reologica.

Spesso conviene dividere tali aree per l'area totale, ottenendosi dei valori di elasticità adimensionalizzata che è più facilmente passibile di essere confrontata. Lo stesso problema non si è posto nel caso della viscosità in quanto la sostanza viscosa di riferimento è per tutti, soggetti sani o malati che siano, l'acqua. Viceversa per l'elasticità occorre riferirsi al totale per poterne fare un confronto effettivo.

I diagrammi che riportano dati di *creep* sono spesso in termini di cedevolezza $J(t)$ definita come il rapporto tra la deformazione e lo sforzo costante applicato, e il modello di correlazione comunemente utilizzato è il cosiddetto modello meccanico viscoelastico lineare di Voigt costituito da una viscosità in parallelo con una elasticità.

Creep di fluidi biologici

Occorre osservare che è piuttosto arduo e talvolta questionabile fare esperimenti e misure sul sangue in toto, mentre sembra decisamente più agevole lavorare su sospensioni di cellule ematiche, patologiche e non, allo scopo di caratterizzarle sia dal punto di vista fluido che elastico. Infatti l'eventuale ingrossamento o l'irrigidimento delle cellule, ovvero un loro incremento come risultato dello stato patologico, comportano notevoli e misurabili effetti sulla reologia delle sospensioni stesse. La tecnica di imporre uno sforzo e misurare la risultante deformazione, si può ben applicare a questo tipo di sospensioni sia bianche sia rosse, per la loro peculiare debolezza dovuta alla spiccata fragilità degli elementi cellulari, ottenendosi così una caratterizzazione reologica più affidabile e precisa che non quella strain rate controllato, che tende a distruggere il sistema considerato.

Imponendo pertanto una funzione a gradino nello sforzo, si può ottenere il valore della cedevolezza $J(t)$ e la tipica risposta delle sospensioni cellulari, prevede un comportamento di tipo viscoelastico (Figura 22), ove si nota che all'aumentare del tempo, non si raggiunge mai una perfetta linearità.

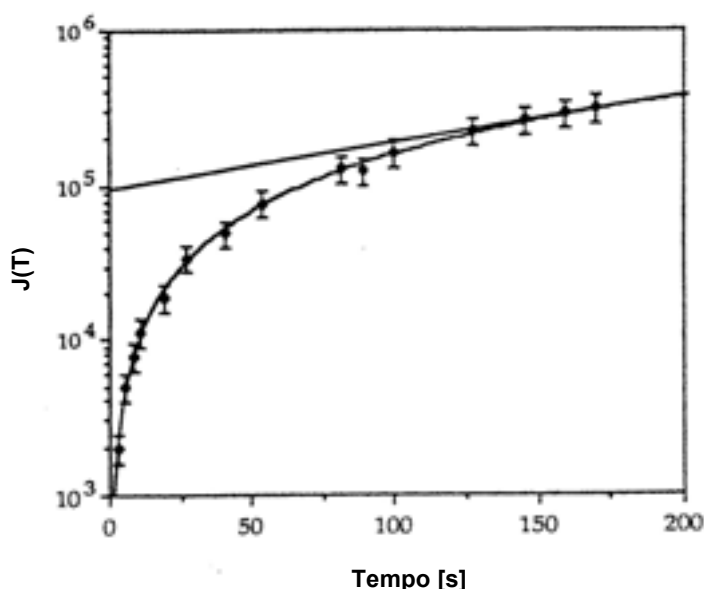


Figura 22. Cedevolezza nel tempo per una sospensione di emazie

In Figura 23 si può osservare che come atteso, la cedevolezza diminuisca all'aumentare della percentuale di ematocrito.

La stessa misura si può eseguire sulle sospensioni linfocitarie (Figura 24), anche se spesso si incontrano serie difficoltà sperimentali sia nella preparazione dei campioni sia nella lettura della deformazione. Si può comunque osservare che in entrambi i casi si hanno andamenti di tipo viscoelastico e in generale si riscontra una minore cedevolezza per i soggetti malati indicativa di un più accentuato comportamento tipo solido.

I dati rilevati con questa nuova tecnica si presentano quindi estremamente interessanti perché in grado di discriminare tra soggetti sani e patologici anche per concentrazioni molto simili, e quindi in grado di coadiuvare altre tecniche diagnostiche attraverso una maggiore comprensione del fenomeno fisiopatologico.

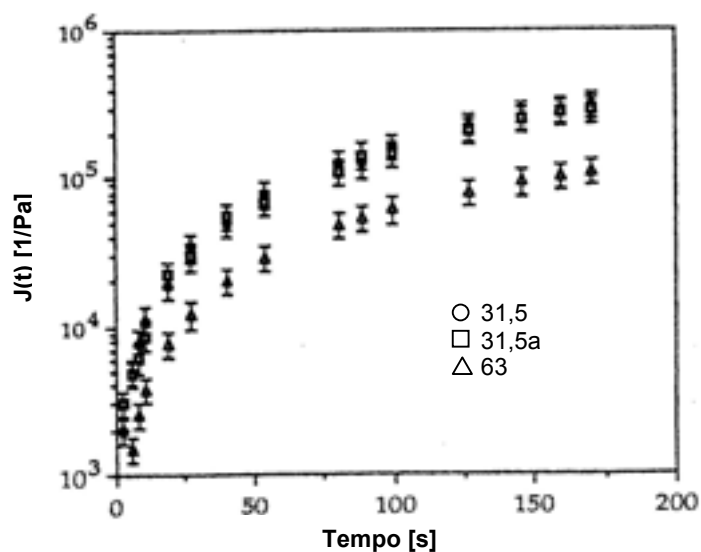


Figura 23. Cedevolezza nel tempo per una sospensione di emazie

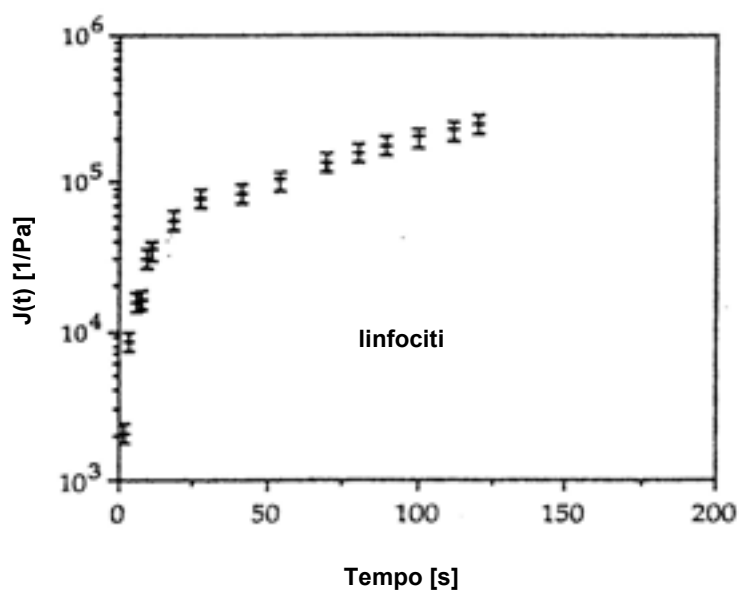


Figura 24. Cedevolezza di una sospensione linfocitaria ($2,9 \times 10^3/\text{mm}^3$)

Un più chiaro confronto può essere realizzato riportando separatamente i contributi viscosi e quelli elastici presenti nella risposta reologica. Per quanto riguarda la viscosità, trattandosi di una sospensione, conviene come al solito esprimere i dati in termini di viscosità relativa, piuttosto che di viscosità assoluta, che è calcolata dall'inverso della pendenza delle rette ottenute linearizzando la parte terminale delle curve di cedevolezza.

Si osserva un incremento della viscosità relativa nel caso delle sospensioni di emazie, dovuto non solo a causa della aumentata concentrazione, che darebbe un incremento proporzionale,

quanto ad una variazione nelle proprietà intrinseche delle cellule (Figura 25). È interessante notare come nel caso delle sospensioni linfocitarie l'andamento è lineare, e comunque la viscosità relativa dei soggetti leucemici sia più bassa di quelli sani (Figura 26).

Il metodo indicato precedentemente per la determinazione della comportamento elastico, è stato applicato sia alle sospensioni ematiche sia a quelle linfocitarie, tenendo conto che al trascorrere del tempo comunque il sistema tende a comportarsi da liquido e pertanto andando ad analizzare essenzialmente la zona ai bassi tempi.

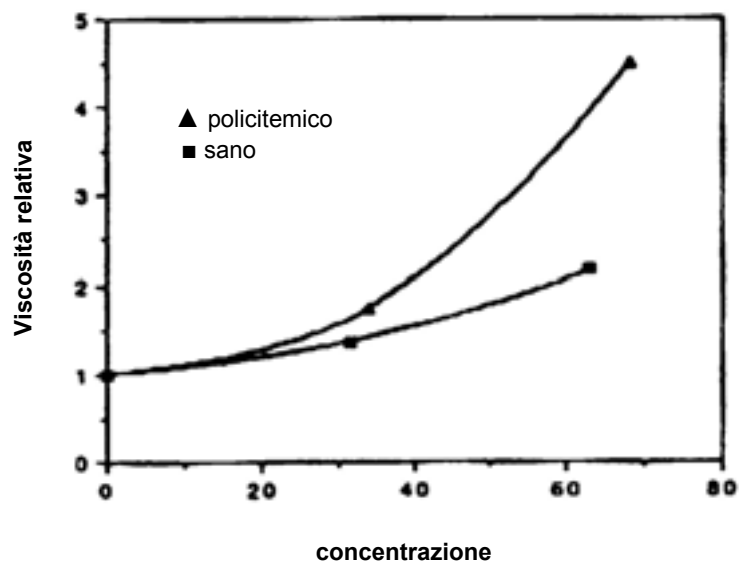


Figura 25. Confronto di sospensioni di emazie tra soggetti sani e policitemici

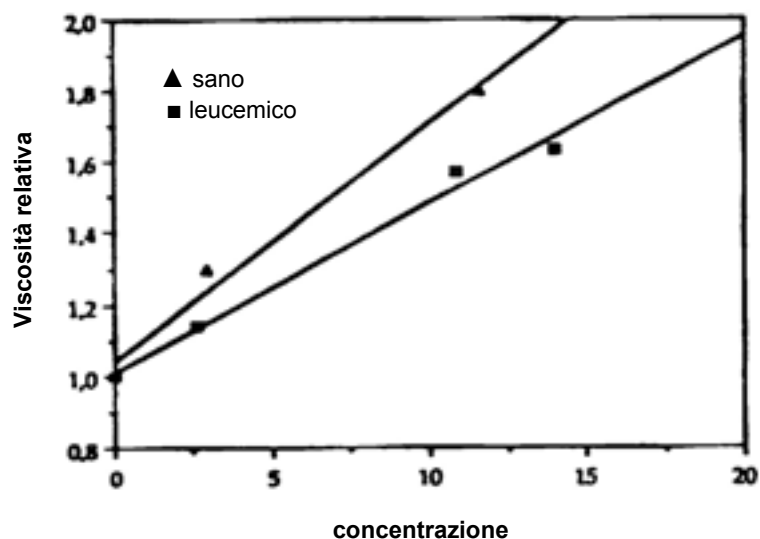


Figura 26. Confronto di sospensioni linfocitarie tra soggetti sani e leucemici

Nel caso delle sospensioni ematiche (Figura 27) il confronto mostra come a parità di elasticità la sospensione più concentrata rilassi prima, in accordo con un comportamento più solido, prevedendo quindi una diminuzione dell'elasticità a parità di tempo. Ciò è generalmente ascrivito a fenomeni di aggregazione cellulare che, realizzando un cambiamento conformazionale, comportano un cambiamento della stessa unità reologica. Se si passa quindi al soggetto malato, appare chiaro che in questo caso non si denota alcun cambiamento rilevabile della risposta reologica al variare della concentrazione, tipico di un materiale più rigido, non tendente ad aggregarsi, e quindi di più facile rottura.

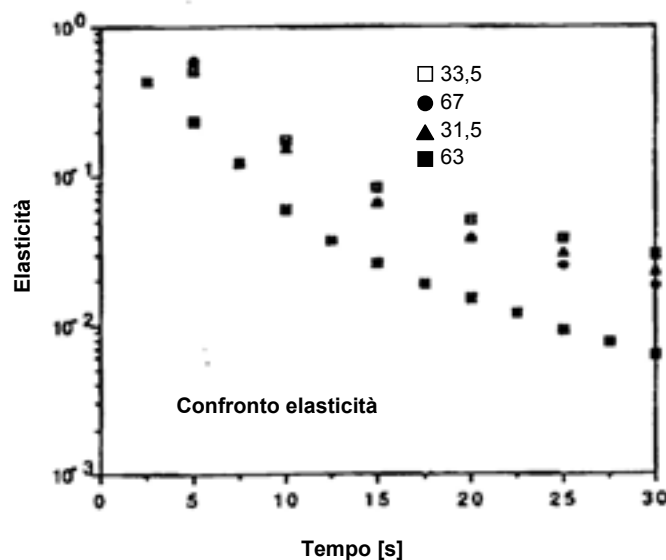


Figura 27. Elasticità adimensionalizzata di sospensioni ematiche di soggetti sani e malati

Il grafico relativo alle sospensioni di globuli bianchi (Figura 28) mostra un comportamento nettamente differente fra cellule normali e patologiche.

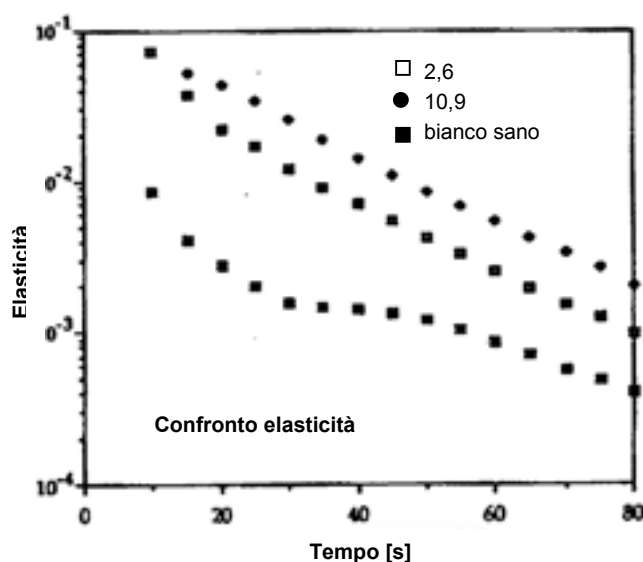


Figura 28. Elasticità adimensionalizzata di sospensioni linfocitaria di soggetti sani e malati

Infatti, appare che le cellule normali, a parità di elasticità, fluiscono a tempi più brevi, indicando perciò un comportamento meno solido rispetto alle cellule patologiche. Questa differenza si esalta all'aumentare della concentrazione delle cellule patologiche, che quindi si mostrano più rigide e pertanto anche più fragili.

Conclusioni

L'analisi dei dati e le tecniche presentate rappresentano quanto oggi si fa nel campo della reologia applicata al sangue. Le metodiche sperimentale illustrate e che vanno dalla classica reometria rotazionale, a quella oscillatoria e infine a quella CS, sono certamente tutte molto innovative per il settore, specialmente se viste alla luce di una loro applicazione non al sangue in toto ma alle sospensioni, così come descritto nell'ultima sezione.

In ogni caso la metodica reologica applicata allo studio della fisiopatologia umana, si mostra molto promettente permettendo una buona discriminazione dei dati, inoltre riapre di nuovo l'interesse nell'emoreologia arricchendola con le nuove tecniche sperimentali e consentendo di ottenere dati relativi alle caratteristiche intrinseche alle cellule ematiche. Infatti sinora questa scienza aveva avuto, con scarso successo, l'obiettivo di fornire dati direttamente diagnostici in sostituzione ad altre tecniche. Lo studio invece delle sospensioni rende invece la reologia uno strumento di supporto alla diagnostica e non una prova simulata delle proprietà del sangue.

La conoscenza delle caratteristiche intrinseche delle cellule patologiche, oltre che di un certo valore discriminante dal punto di vista diagnostico, come già osservato, hanno anche un risultato di utilità nella pratica clinica quotidiana, basti pensare ai valori di soglia di *Ht* attualmente utilizzati nella pratica del salasso in sindromi da iperviscosità, che invece potrebbero essere più propriamente sostituiti da rilevazioni reologiche che potrebbero indicare situazioni di rischio a valori di *Ht* ritenuti invece ancora accettabili.

Da quanto esposto, appare chiaro che bisogna riprendere a lavorare nella emoreologia sotto questa nuova luce, per potere rispondere a queste promettenti evidenze.

Bibliografia di riferimento

Bove M, Nunziata G, Santoro G, de Cindio B, Immaturo V. L'elastoviscosimetria nella patologia maxillo-facciale. *Stomat Mediter* 1991; 9:11-15.

de Cindio B. *Lezioni di Reologia. Dispense*. Facoltà di Ingegneria, Università degli Studi della Calabria; 2002.

de Cindio B. *Lezioni di Reologia. Dispense*. Corso di aggiornamento in Ematologia, Università di Napoli; 2001.

Dintenfass L. *Blood viscosity: hyperviscosity and hyperviscosaemia*. Kluwer Academic Publishers; 1985.

LA TECNICA REOLOGICA DEL *CREEP* APPLICATA A COMPONENTI EMATICHE COME AIUTO DIAGNOSTICO NELLE NEOPLASIE MALIGNI

Paolo D'Antona (a), Giuseppe Nunziata (b), Giovanni D'Arena (b), Domenico Gabriele (c),
Bruno de Cindio (c)

(a) *EniTecnologie, S. Donato Milanese (MI)*

(b) *Dipartimento di Oncoematologia, Azienda Ospedaliera S. G. di Dio e R. D'Aragona, Salerno*

(c) *Dipartimento di Ingegneria Chimica e dei Materiali, Università della Calabria, Rende (CS)*

Introduzione

Lo studio delle proprietà reologiche del sangue, o emoreologia, è un settore multidisciplinare della medicina che ha trovato un crescente interesse negli ultimi anni. Gli studiosi che si interessano di Emoreologia sono di varia estrazione e se ne interessano ognuno con taglio peculiare, infatti i campi di investigazione sono tra essi, solo apparentemente, poco o niente correlabili. La viscosità del sangue è un parametro largamente utilizzato sia nello studio di alcune patologie sia per lo studio di organi artificiali. Nonostante ciò nell'effettuare misure sul sangue in toto si trovano notevoli difficoltà nel condizionare il campione per riprodurre le condizioni vascolari. Partendo da queste considerazioni, negli ultimi anni è aumentato il numero di lavori dedicati allo studio di alcune componenti ematiche, nel cui caso non è necessario riprodurre le condizioni all'interno dei vasi e si può realizzare una caratterizzazione strettamente legata solo al comportamento della componente considerata.

L'obiettivo di questo lavoro è quello di illustrare le potenzialità di una tecnica reologica "non classica" come il *creep*, applicandola allo studio di componenti ematiche separate, ottenute da individui affetti da alcune patologie, per verificarne la possibilità di impiego come tecnica diagnostica ausiliaria, adottabile accanto a quelle tradizionali.

La "classica" misura di viscosità, tradizionalmente adottata nel settore dell'emoreologia, è una cinematica stazionaria, in cui il campione viene sottoposto ad un flusso a taglio in condizioni stazionarie. Benché questa misura sia estremamente utile nei cosiddetti flussi equivalenti, non lo è, invece, per una caratterizzazione del materiale in quanto risulta funzione della storia di deformazione (1). Inoltre, il comportamento "tipo-solido", presente nelle componenti ematiche, viene del tutto ignorato perché questo tipo di misura consente di studiare solo la componente "liquida" (ossia proprio la viscosità) del materiale esaminato. Lo studio dei fluidi complessi richiede l'introduzione della variabile tempo per poter tener conto correttamente dei due contributi (1).

Tenendo conto di queste osservazioni sembra conveniente proporre l'applicazione di una metodica differente, in grado di offrire maggiori informazioni, per questo motivo si è fatto ricorso alle cosiddette "cinematiche in transitorio" in cui si segue la risposta del campione sottoposto ad una sollecitazione, in funzione del tempo.

È evidente come, in questi casi, ai tempi brevi, corrispondenti ad elevati numeri di Deborah, si possa mettere in evidenza il comportamento "solido" del materiale, mentre ai tempi lunghi, quindi per bassi numeri di Deborah, prevale il comportamento "tipo liquido".

In questo lavoro l'attenzione è stata focalizzata sulla misura in transitorio detta *creep*, in cui un campione viene sottoposto istantaneamente (o quasi, per limiti strumentali) ad uno sforzo costante a gradino (Figura 1) e viene misurata la sua deformazione nel tempo.

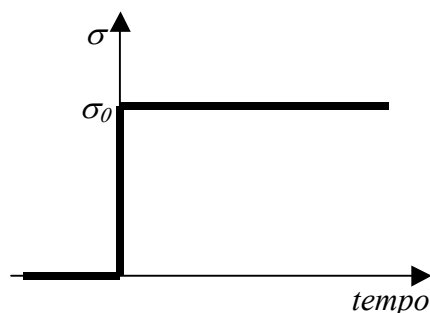


Figura 1. Sollecitazione applicata in una prova di *creep*

La risposta di un solido elastico ideale sarà una deformazione costante nel tempo, mentre quella di un liquido newtoniano sarà una deformazione che cresce indefinitamente (Figura 2).

Un fluido complesso, invece, esibisce un comportamento intermedio: a bassi tempi presenta un certo ritardo legato alla viscoelasticità del materiale, mentre a tempi lunghi fluisce come un liquido (fluido viscoelastico); se il materiale presenta uno sforzo di soglia (o *yield stress*) la risposta a tempi lunghi è quella tipica di un solido ideale, con deformazione costante nel tempo (2) (Figura 3).

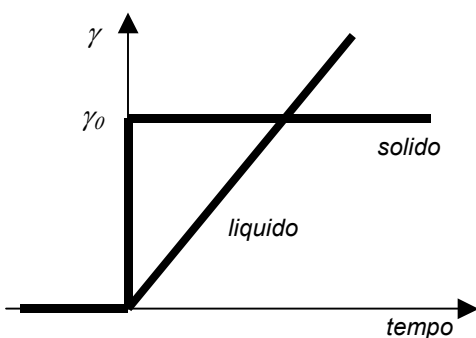


Figura 2. Comportamento liquido ideale e solido ideale in un *creep*

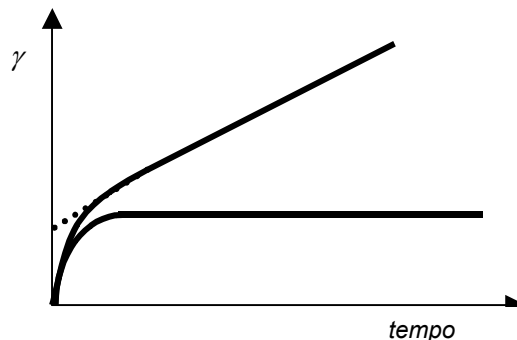


Figura 3. Comportamento viscoelastico ed elastoviscoso in un *creep*

La prova di *creep* presenta un vantaggio, legato anche alla modalità di svolgimento: l'applicazione di uno sforzo sulla superficie del campione non implica a priori la scelta del tipo di comportamento, come accade invece, quando si applica una deformazione (per i solidi) o una velocità di deformazione (per i liquidi); in questo modo è resa più semplice l'analisi di sistemi debolmente strutturati come ad esempio il sangue.

Materiali e metodi

Sono stati sottoposti a misure, secondo la tecnica reologica descritta precedentemente, le sospensioni cellulari preparate da sangue venoso periferico di 4 soggetti adulti dei quali uno sano e 3 affetti da leucemia linfatica cronica; i campioni di sangue sono stati sottoposti ad una tecnica di separazione attualmente in fase di ottimizzazione. Sono stati prelevati, con sistema

Vacutainer, da ogni paziente circa 20 ml di sangue venoso, reso incoagulabile mediante EDTA (il tipo di anticoagulante non influenza le misure come evidenziato da alcuni degli autori in un precedente studio) (3).

Separazione globuli bianchi

Il sangue separato dal plasma ricco di piastrine è stato diluito con PBS nel rapporto 1:2 e poi stratificato su Fycoll Hypack. Il tutto è stato sottoposto a centrifugazione, alla temperatura di 4-6 °C, a 3000 giri/30 minuti. Dopo la centrifugazione, è stato prelevato l'anello contenente i leucociti e sospeso in soluzione *buffer* di PBS. La sospensione così preparata è stata sottoposta a triplice lavaggio utilizzando la stessa soluzione PBS e, infine, i campioni sono stati sospesi in PBS, alle concentrazioni desiderate.

Separazione globuli rossi

Le sospensioni di globuli rossi sono state ottenute mediante una sola centrifugazione a 1000 giri/10 minuti. Le sospensioni emaziali sono state sottoposte a triplice lavaggio in PBS e quindi portate ai valori di concentrazione percentuale desiderati.

Tutti i campioni sono stati conservati alla temperatura di 4 °C sino al momento della misura. I campioni ottenuti sono stati caratterizzati attraverso un'analisi mediante analizzatore automatico per definirne la purezza (vedi Tabelle 1-4).

Tabella 1. Composizione del campione di globuli bianchi in fisiologica

Caso	Patologia	WBC [k/ μ l]	RBC [M/ μ l]	PLT [k/ μ l]
C.L.	LLC	5,20	0,03	234,00
F.G.	LLC	56,20	0,00	392,00
M.P.	LLC	9,09	0,02	207,00
G.N.	Sano	3,20	0,00	77,40

Tabella 2. Composizione del campione di globuli bianchi in plasma

Caso	Patologia	WBC [k/ μ l]	RBC [M/ μ l]	PLT [k/ μ l]
C.L.	LLC	5,21	0,056	371,1
F.G.	LLC	40,7	0	94,1
M.P.	LLC	5,16	0,008	106
G.N.	Sano	3,2	0,014	75

Tabella 3. Composizione del campione di globuli rossi in plasma

Caso	Patologia	WBC [k/ μ l]	RBC [M/ μ l]	PLT [k/ μ l]	MCV [fl]
C.L.	LLC	3,03	5,57	7,87	79,30
F.G.	LLC	5,50	0,96	8,17	93,80
M.P.	LLC	0,15	1,40	10,80	75,10
G.N.	Sano	1,00	2,39	9,39	82,50

WBC: Whole Blood Cell, globuli bianchi; **RBC:** Red Blood Cell, globuli rossi; **PLT:** Platelet, piastrine; **MCV:** Mean Corpuscular Volume, volume corpuscolare medio

Tabella 4. Composizione del campione di globuli rossi in fisiologica

Caso	Patologia	WBC [k/ μ l]	RBC [M/ μ l]	PLT [k/ μ l]	MCV [fl]
C.L.	LLC	1,24	2,44	6,37	79,60
F.G.	LLC	6,01	1,62	0,00	95,00
M.P.	LLC	0,04	3,34	0,00	77,10
G.N.	Sano	0,57	1,00	3,93	83,20

Tutti i campioni sono stati sottoposti a misure di *creep* alla temperatura di 36,5 °C, su un reometro a sforzo controllato (DSR 200, Rheometric Scientific, USA) usando una geometria a piatti paralleli ($\phi=40$ mm), con un *gap* di 0,5 mm e uno sforzo di 0,1 Pa, tale da ridurre al minimo il disturbo indotto sul campione.

La risposta sperimentale è stata riportata in termini di cedevolezza:

$$J(t) = \frac{\gamma(t)}{\sigma_0} \quad [1]$$

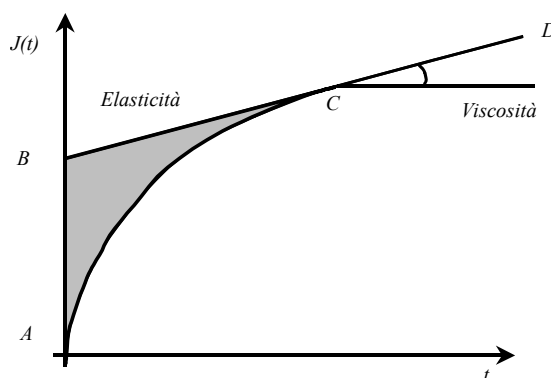
dove σ_0 è lo sforzo applicato. La curva ottenuta può essere approssimativamente suddivisa in due tratti (Figura 4):

1. un tratto BC, a tempi lunghi, in cui prevale il comportamento liquido, la pendenza del tratto lineare coincide col reciproco della viscosità del fluido (2);

$$\eta = \frac{l}{\text{pendenza}} \quad [2]$$

2. un tratto AB, a tempi brevi, in cui prevale il comportamento solido. L'area racchiusa tra la tangente BD e la curva, ad ogni istante, può essere considerata una misura dell'elasticità del materiale. Per poter effettuare un confronto tra campioni diversi, l'elasticità ad ogni istante t è stata rapportata all'elasticità complessiva (rappresentata in figura dall'area tratteggiata) (3).

$$E(\%) = \frac{E(t)}{E_{\text{totale}}} \quad [3]$$

**Figura 4. Analisi della curva di creep**

La viscosità viene spesso riportata in funzione della concentrazione utilizzando le correlazioni usualmente adottate per le sospensioni, la più comune, per basse concentrazioni, ad esempio è quella di Jeffery:

$$\eta = \eta_0 (1 + A\phi) \quad [4]$$

in cui η_0 è la viscosità del mezzo sospendente e ϕ la concentrazione volumetrica.

Risultati e discussione

Nelle Figure 5 e 6 sono riportati alcuni risultati di letteratura che mostrano il confronto tra campioni di componenti ematiche separate (globuli bianchi e globuli rossi) per individui sani, affetti da leucemia linfatica cronica e da policitemia e macrocitosi (Tabella 5) (3).

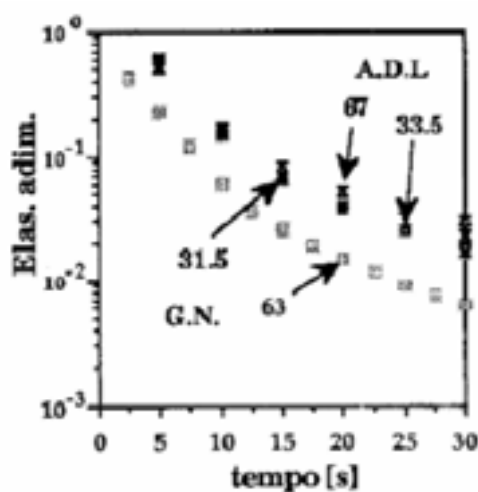


Figura 5. Elasticità adimensionale per i campioni G.N. (sano) e A.D.L. (policitemico)

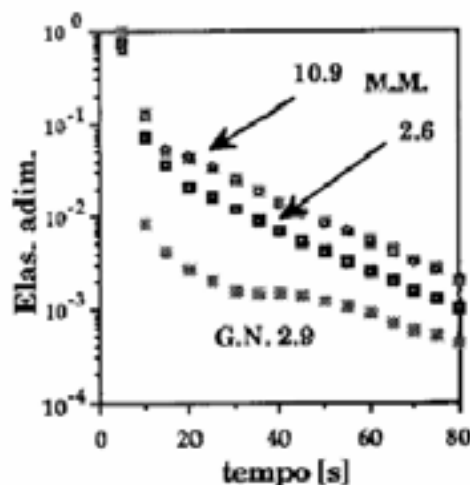


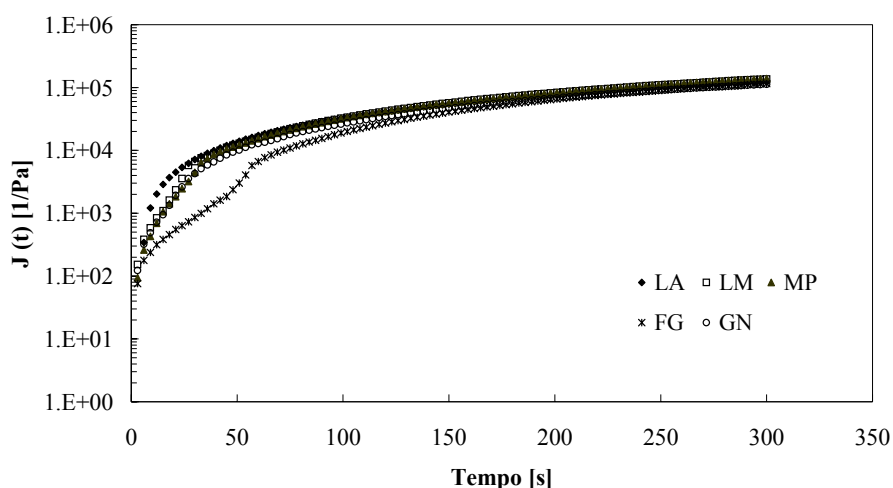
Figura 6. Elasticità adimensionale per i campioni G.N. (sano) e M.M. (LLC)

Tabella 5. Caratteristiche dei campioni di sangue

Casi	Patologia	WBC [$10^3/\text{mm}^3$]	RBC [$10^6/\text{mm}^3$]
G.N.	<i>Sano</i>	4,6	5,1
M.M.	<i>LLC</i>	17,8	—
A.D.L.	<i>Policitemia</i>	—	6,14

Si nota che i globuli bianchi del campione affetto da LLC mostrano una maggiore elasticità, probabilmente dovuta agli effetti della patologia che provoca un irrigidimento delle cellule. Risultati analoghi si ottengono confrontando le emazie di individui sani e affetti da policitemia. La tecnica, quindi sembra distinguere tra campioni “sani” e “malati”; per poter approfondire l’analisi sono state svolte altre misure su campioni di vari individui, tutti affetti da LLC.

In Figura 7 è riportato come esempio l’andamento dei *creep* ottenuti per i campioni di globuli rossi in plasma e di globuli bianchi in soluzione fisiologica. Le curve ricavate sono tutte molto simili tra di loro per cui è molto difficile apprezzare delle differenze significative.

**Figura 7. Andamento dei *creep* per campioni di globuli rossi in plasma**

L’analisi dei risultati “a tempi lunghi”, ha consentito di ricavare il valore di viscosità per le diverse concentrazioni, in Figura 8 sono riportati i risultati ottenuti per i globuli rossi in plasma, in funzione della frazione volumetrica. Si nota che i valori per i diversi campioni sembrano seguire abbastanza bene un andamento quasi lineare, come quello previsto dall’equazione 1. È importante notare che il campione dell’individuo sano si dispone insieme a quello degli individui affetti da LLC, questo è dovuto al tipo di patologia che non altera il comportamento dei globuli rossi.

Risultati analoghi si trovano anche per i campioni in soluzione fisiologica; i valori assoluti di viscosità sono differenti a causa del diverso mezzo sospendente (fisiologica al posto di plasma) e delle diverse concentrazioni (Figura 9).

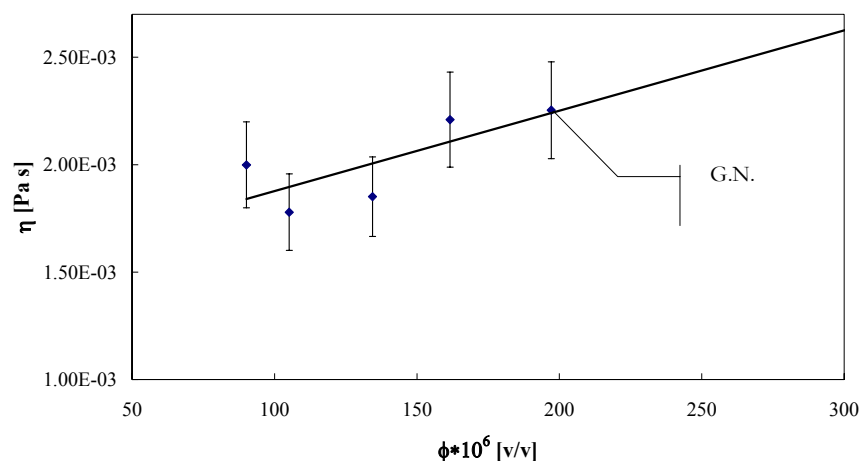


Figura 8. Viscosità in funzione della concentrazione volumetrica per campioni di globuli rossi in plasma

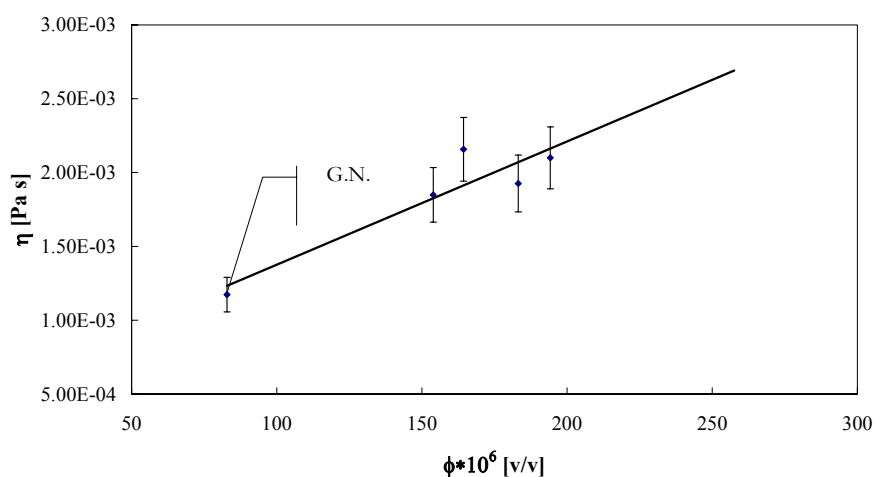


Figura 9. Viscosità in funzione della concentrazione volumetrica per campioni di globuli rossi in fisiologica

I risultati ottenuti per le sospensioni di globuli bianchi sono riportati in Figura 10 in funzione del numero di cellule, si nota che i campioni, pur avendo differenti concentrazioni, mostrano valori quasi uguali di viscosità (il discostamento maggiore si nota per il campione MP); questo può essere giustificato tenendo conto dell'irrigidimento e della conseguente fragilità delle cellule malate che sottoposte ad uno sforzo (sebbene piccolo) per un lungo tempo possono rompersi.

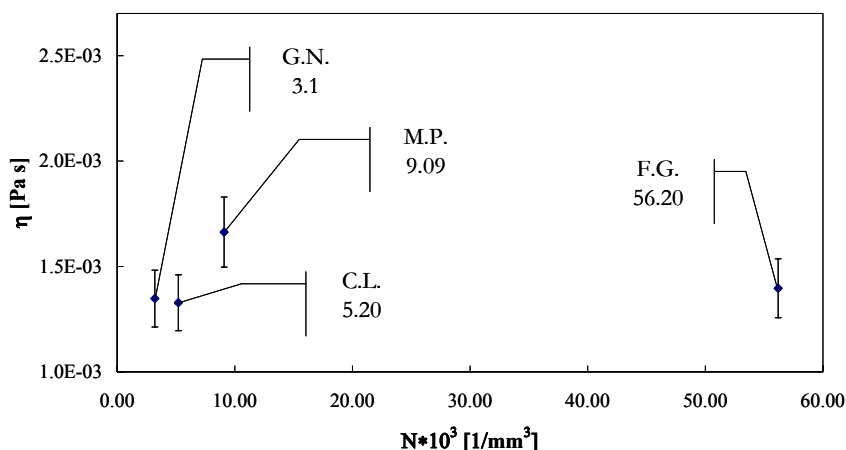


Figura 10. Viscosità in funzione del numero di particelle per campioni di globuli bianchi in fisiologica

Il comportamento solido, come già accennato, può essere descritto attraverso la valutazione dell'elasticità a bassi tempi. I risultati ottenuti per i globuli bianchi in soluzione fisiologica sono riportati in Figura 11.

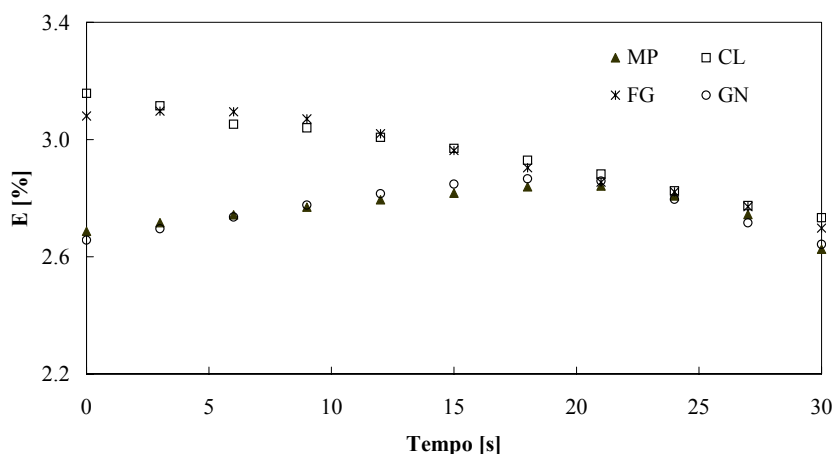


Figura 11. Elasticità adimensionale per campioni di globuli bianchi in fisiologica

Si nota che i campioni CL e FG mostrano valori di E più elevati, rispetto a GN (il controllo sano) e molto simili tra di loro nonostante la differenza di concentrazione; questo è dovuto, probabilmente, al comportamento più rigido delle cellule, poco tendente all'aggregazione.

Il comportamento del campione MP sembra di più difficile spiegazione, probabilmente la combinazione della diversa concentrazione e di una diversa deformabilità provoca un comportamento della sospensione molto simile a quella di GN. Questo andamento, d'altra parte, conferma quello già descritto per la viscosità, in cui MP è l'unico ad avere un valore leggermente più alto degli altri.

Risultati analoghi si ottengono dall'esame delle sospensioni in plasma (Figura 12) in cui CL e FG mostrano un andamento praticamente uguale e valori maggiori rispetto a MP.

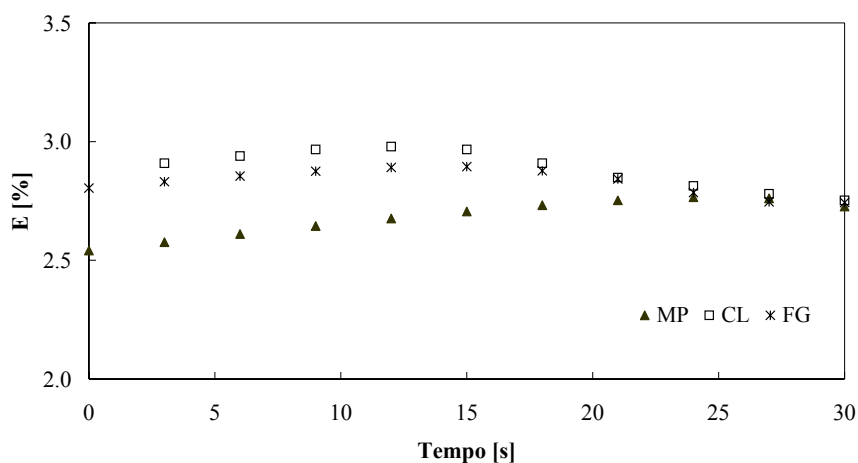


Figura 12. Elasticità adimensionale per campioni di globuli bianchi in plasma

Conclusioni

La tecnica reologica del *creep*, presentata in questo lavoro costituisce una possibile alternativa alle procedure “tradizionali” basate essenzialmente sulla viscosità; il suo principale vantaggio è legato alla possibilità di fornire una misura del comportamento *solid-like* di un materiale attraverso l'applicazione di uno sforzo, più vantaggioso per lo studio di sistemi debolmente strutturati, rispetto alle deformazioni o alle *shear rate*.

I risultati ottenuti su componenti ematiche separate, hanno evidenziato la presenza di differenze tra campioni di individui sani e di individui malati, riconducibili al tipo di patologia esistente. Tale metodica, dunque sembra estremamente promettente, anche se richiede ancora un'ulteriore messa a punto e una verifica su un maggiore numero di campioni.

Bibliografia

1. Ferry JD. *Viscoelastic properties of polymers*. New York: John Wiley and sons; 1980.
2. Whorlow R W. *Rheological techniques*. England: Ellis Horwood Limited; 1980.
3. Nunziata G, Sedda R, Carbone A, D'Antona P, de Cindio B. *Proprietà reologiche di sospensioni di cellule ematiche*, III Convegno Nazionale di Reologia Applicata, S. Donato Milanese; 1995.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, giugno 2003 (n. 2) 7° Suppl.