

**POLITECNICO DI MILANO**

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



Ottimizzazione di un Protocollo Sperimentale volto  
all'Analisi del Potenziale Trombogenico di Dispositivi  
per il Trattamento del Sangue

Relatore: Prof. Alberto Redaelli

Co-relatore: Prof. Gianfranco B. Fiore

Ing. Filippo Consolo

Tesi di Laurea di:

Giulia Marazzato Matr. 782223

Valentina Teodolinda Vincoli Matr. 787059

Anno Accademico 2013 - 2014

# Indice

Lista delle tabelle.....	pag. vi
Lista delle Figure.....	pag. viii
Lista della abbreviazioni.....	pag. xii
Sommario.....	pag. xiii
Abstract.....	pag. xxviii
<b>1. Introduzione.....</b>	<b>pag. 1</b>
1.1 Ambito di interesse.....	pag. 3
1.2 Problematiche associate ai dispositivi medici a contatto con il sangue: emolisi e trombogenicità.....	pag. 7
1.3 Fattori alla base dell'attivazione piastrinica.....	pag. 11
<b>2. Stato dell'arte.....</b>	<b>pag. 14</b>
2.1 Approcci di tipo sperimentale.....	pag. 14
2.1.1 Aggregometro di Born.....	pag. 14
2.1.2 Viscosimetro a rotazione e saggi chimici.....	pag. 16
2.1.3 Emoresistometro di Fleisch.....	pag. 21
2.1.4 Citometria a flusso.....	pag. 22
2.1.5 Digital Particle Image Velocimetry (DPIV) .....	pag. 25
2.1.6 Modelli empirici per l'attivazione piastrinica .....	pag. 26
2.2 Approcci di tipo numerico: simulazioni di fluidodinamica computazionale.....	pag. 28
2.3 Approcci combinati sperimentali e numerici.....	pag. 30

2.3.1 Device Thrombogenicity Emulation (DTE) .....	pag. 31
2.3.1.1 Hemodynamic Shearing Device (HSD) .....	pag. 33
2.3.1.2 Platelet Activation State Assay (PAS assay) .....	pag. 35
2.3.2 Applicazione del DTE nello studio dell'attivazione piastrinica dei dispositivi medici a contatto con il sangue.....	pag. 37
<b>3. Protocolli sperimentali per il PAS assay.....</b>	<b>pag. 40</b>
3.1 Il PAS <i>assay</i> .....	pag. 40
3.1.1 Collezione del sangue intero ed estrazione del PRP.....	pag. 41
3.1.1.1 Ottimizzazione del protocollo di centrifugazione.....	pag. 45
3.1.2 Estrazione del GFP.....	pag. 46
3.1.3 Conta piastrinica.....	pag. 52
3.1.3.1 Calibrazione del <i>Coulter Particle Counter</i> .....	pag. 54
3.1.4 Preparazione del campione per l'esperimento.....	pag. 56
3.1.5 Sonicazione.....	pag. 57
3.1.5.1 Ottimizzazione del protocollo di sonicazione.....	pag. 59
3.1.6 Lettura spettrofotometrica.....	pag. 61
3.1.7 Acetilazione della protrombina.....	pag. 64
<b>4. Risultati e discussione.....</b>	<b>pag. 69</b>
4.1 Definizione del protocollo di centrifugazione dei campioni di sangue intero.....	pag. 69
4.2 Calibrazione del <i>Coulter Particle Counter</i> .....	pag. 71
4.3 Definizione del protocollo di sonicazione dei campioni.....	pag. 78

4.3.1 Fase I: identificazione del valore di potenza ottimale.....	pag. 79
4.3.2 Fase II: individuazione della durata di applicazione dello stimolo.....	pag. 82
4.4 Acetilazione della protrombina.....	pag. 85
<b>5. Applicazione del PAS assay: studio della trombogenicità di due differenti modelli di ossigenatori neonatali.....</b>	<b>pag. 87</b>
5.1 Ossigenatore neonatale Kids D100.....	pag. 89
5.2 Descrizione del set-up sperimentale.....	pag. 91
5.3 Svolgimento del PAS assay .....	pag. 95
5.3.1 Prelievo del sangue ed estrazione del PRP.....	pag. 96
5.3.2 Ottenimento del GFP.....	pag. 98
5.3.3 Conta piastrinica.....	pag. 98
5.3.4 Preparazione dei campioni EXP.....	pag. 99
5.3.5 Sonicazione.....	pag. 99
5.3.6 Lettura spettrofotometrica.....	pag. 100
5.3.7 Prelievo ed analisi dei campioni piastrinici.....	pag. 100
5.4 Risultati e discussione.....	pag. 101
<b>6. Conclusioni e sviluppi futuri.....</b>	<b>pag. 105</b>
6.1 Il PAS assay come metodo di analisi quantitativa dell'attivazione piastrinica <i>in vitro</i> .....	pag. 105
6.2 Sviluppi futuri.....	pag. 110
Appendice A.....	pag. 112

Appendice B.....pag. 123  
Bibliografia.....pag. 144

## LISTA DELLE TABELLE

<b>Tabella 3.1:</b> Test di centrifugazione di campioni di sangue intero di origine bovina eseguiti al fine di ottimizzare il protocollo di centrifugazione.....	pag. 45
<b>Tabella 3.2:</b> Soluzioni a concentrazione nota preparate per verificare la calibrazione effettuata.....	pag. 55
<b>Tabella 3.3:</b> Equazioni per il calcolo dei reagenti che costituiranno l'EXP.....	pag. 56
<b>Tabella 3.4:</b> Protocolli di sonicazione di campioni piastrinici eseguiti al fine di scegliere il valore di potenza ottimale con il quale stimolare le piastrine.....	pag. 60
<b>Tabella 3.5:</b> Protocolli di sonicazione di campioni piastrinici eseguiti al fine di individuare l'intervallo di tempo ottimale di applicazione dello stimolo.....	pag. 60
<b>Tabella 3.6:</b> Parametri di lettura dello spettrofotometro.....	pag. 64
<b>Tabella 4.1:</b> Valori medi $\pm$ deviazione standard di volume di PRP e concentrazione di piastrine/ $\mu\text{l}_{\text{PRP}}$ (cinque letture per ciascun campione) calcolati per ciascuno dei diversi protocolli di centrifugazione testati.....	pag. 70
<b>Tabella 4.2:</b> Verifica della procedura di calibrazione del <i>Coluter Particle Counter</i> con la soluzione Cal <sub>7gocce</sub> .....	pag. 72
<b>Tabella 4.3:</b> : Verifica della procedura di calibrazione del <i>Coulter Particle Counter</i> con le soluzioni Cal <sub>10gocce</sub> e Cal <sub>20gocce</sub> .....	pag. 74
<b>Tabella 4.4:</b> Valori di attivazione piastrinica (media $\pm$ deviazione standard) ottenuti a parità di durata dello stimolo (10 sec) ed al variare della potenza della sonicazione dei campioni piastrinici.....	pag. 79
<b>Tabella 4.5:</b> Valori di Abs_slope e $\Delta$ Concentrazione misurati nei campioni sottoposti ai protocolli di sonicazione S1 <sub>10s</sub> e S5 <sub>10s</sub> .....	pag. 81

<b>Tabella 4.6:</b> Valori Abs_slope e $\Delta$ Concentrazione misurati nei campioni sottoposti a protocolli di sonicazione di durata variabile, a parità di potenza dello stimolo (S1).....	pag. 83
<b>Tabella 4.7:</b> Valori di $A_{280}$ dei campioni di FII.....	pag. 86
<b>Tabella 5.1:</b> Volumi di PRP e GFP ricavati nei due esperimenti.....	pag. 98
<b>Tabella 5.2:</b> Concentrazione di piastrine/ $\mu$ l del GFP relativo ai due esperimenti....	pag. 98
<b>Tabella 5.3:</b> Volumi di GFP, $\text{CaCl}_2$ 50 Mm e PB 1x per la diluizione dell'EXP.....	pag. 99
<b>Tabella 5.4:</b> Valori di attivazione in termini di pendenza media e attivazione % dei campioni piastrinici prelevati a tempi stabiliti dal circuito con ossigenatore costituito da fibre polimeriche “nude” e fibre rivestite da fosforilcolina.....	pag. 101

## LISTA DELLE FIGURE

<b>Figura 1.1:</b> Rappresentazione schematica dei componenti che compongono il circuito di CEC.....	pag. 6
<b>Figura 1.2:</b> Piastrine non attivate (A) e piastrine attivate (B).....	pag. 8
<b>Figura 1.3:</b> Piastrine attivate.....	pag. 10
<b>Figura 1.4:</b> Schema del processo che porta dall'attivazione piastrinica alla formazione del trombo.....	pag. 11
<b>Figura 2.1:</b> Principio di funzionamento alla base dell'aggregometro di Born.....	pag. 15
<b>Figura 2.2:</b> (a) viscosimetro di Couette; (b) viscosimetro cono-piatto.....	pag. 17
<b>Figura 2.3:</b> Modifiche apportate al viscosimetro cono-piatto da parte di Hellums....	pag. 19
<b>Figura 2.4:</b> Soglia di attivazione piastrinica e di emolisi dei globuli rossi in funzione dell'intensità dello stimolo (sforzo di taglio) e del tempo di esposizione della sollecitazione.....	pag. 20
<b>Figura 2.5:</b> componenti dell'emoresistometro di Fleisch.....	pag. 21
<b>Figura 2.6:</b> Schema di funzionamento della citometria a flusso.....	pag. 23
<b>Figura 2.7:</b> Le traiettorie, simulate tramite modello CFD, seguite dalle piastrine attraverso il passaggio nel VAD (A).....	pag. 29
<b>Figura 2.8:</b> Schema a blocchi dell'analisi del potenziale trombogenico di un prototipo di ossigenatore a fibre cave mediante tecnica DTE.....	pag. 33
<b>Figura 2.9:</b> Riproduzione schematica dell' <i>Hemodynamic Shearing Device</i> .....	pag. 33
<b>Figura 2.10:</b> La cascata della coagulazione modificata in presenza della protrombina acetilata.....	pag. 36



<b>Figura 3.1:</b> Falcon contenenti circa 30 ml di sangue intero che verrà sottoposto a centrifugazione.....	pag. 42
<b>Figura 3.2:</b> (A) centrifuga, (B) rotore a bracci oscillanti.....	pag. 43
<b>Figura 3.3:</b> Separazione tra PRP e globuli rossi a seguito della procedura di centrifugazione del sangue intero di origine bovina.....	pag. 44
<b>Figura 3.4:</b> PRP estratto a seguito della procedura di centrifugazione di sangue intero di origine bovina.....	pag. 44
<b>Figura 3.5:</b> Sistema di filtrazione per l'estrazione del GFP.....	pag. 47
<b>Figura 3.6:</b> (A) pH-metro elettronico, (B) elettrodo a vetro.....	pag. 48
<b>Figura 3.7:</b> Elettrodo a vetro per la misurazione del pH.....	pag. 49
<b>Figura 3.8:</b> Rifrattometro per la misurazione dell'indice di rifrazione del SA e del PB 1x.....	pag. 50
<b>Figura 3.9:</b> Shaker basculante.....	pag. 51
<b>Figura 3.10:</b> (A) <i>Coulter Particle Counter</i> , (B) <i>Aperture Tube</i> immersa in una <i>cup</i> contenente la soluzione elettrolitica di in cui è immerso il campione di GFP.....	pag. 52
<b>Figura 3.11:</b> Componenti counter coulter.....	pag. 53
<b>Figura 3.12:</b> Sonicatore a sonda.....	pag. 58
<b>Figura 3.13:</b> Bagno termostatico.....	pag. 62
<b>Figura 3.14:</b> Sistema di lettura spettrofotometrica.....	pag. 63
<b>Figura 3.15:</b> Tubi per dialisi utilizzati per inserire il FII.....	pag. 65
<b>Figura 3.16:</b> Il becher contenente la soluzione dializzante in cui sono immersi i tubi contenenti il FII, è posto su agitatore magnetico e mantenuto in frigorifero alla temperatura di 37°C per tutta la notte.....	pag. 66

<b>Figura 3.17:</b> Inserimento della soluzione dializzata nella Falcon da 15 ml.....	pag. 67
<b>Figura 4.1:</b> Volume di PRP e concentrazione di piastrine/ $\mu\text{l}_{\text{PRP}}$ ottenuti a seguito delle diverse procedure di centrifugazione.....	pag. 70
<b>Figura 4.2:</b> Risultati della verifica della procedura di calibrazione del <i>Coulter Particle Counter</i> effettuata con la soluzione Cal <sub>7gocce</sub> .....	pag. 73
<b>Figura 4.3:</b> Risultati della verifica della procedura di calibrazione del <i>Coluter Particle Counter</i> effettuata con le soluzioni Cal <sub>7gocce</sub> , Cal <sub>10gocce</sub> e Cal <sub>100gocce</sub> .....	pag. 75
<b>Figura 4.4:</b> Rette di calibrazione per ciascuna delle procedure di calibrazione testate sul <i>Coulter Particle Counter</i> .....	pag. 76
<b>Figura 4.5:</b> Variazione di Abs nel tempo di un campione piastrinico rilevata durante la lettura spettrofotometrica.....	pag. 78
<b>Figura 4.6:</b> Valori di attivazione piastrinica (Abs_slope) dei campioni piastrinici sottoposti a procedure di sonicazione caratterizzate da stessa durata dello stimolo (10 sec) ma differente livello di potenza.....	pag. 80
<b>Figura 4.7:</b> Valori di Abs_slope e $\Delta$ Concentrazione misurati nei campioni sottoposti ai protocolli di sonicazione S1_10s e S5_10s.....	pag. 81
<b>Figura 4.8:</b> Valori di Abs_slope e $\Delta$ Concentrazione % misurati nei campioni sottoposti a protocolli di sonicazione di durata variabile, a parità di potenza dello stimolo (S1 = 7W).....	pag. 84
<b>Figura 5.1:</b> rappresentazione schematica del circuito della CEC.....	pag. 88
<b>Figura 5.2:</b> Ossigenatore Kids D100, prodotto dalla SGI.....	pag. 90
<b>Figura 5.3:</b> Portate di scambio di O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> al variare della portata del sangue che fluisce all'interno dell'ossigenatore.....	pag. 91

<b>Figura 5.4:</b> Rappresentazione schematica del circuito (A); Set-up sperimentale (B) utilizzato per l'analisi del rischio trombogenico associato agli ossigenatori neonatali Kids D100.....	pag. 92
<b>Figura 5.5:</b> Riserva inserita nel bagno termostatico.....	pag. 93
<b>Figura 5.6:</b> Attivazione % dei campioni piastrinici misurata nel corso dell'esperimento.....	pag. 102

## LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ATP</b>	Adenosina difosfato
<b>BHVs</b>	Biologic Heart Valves
<b>CEC</b>	Circolazione Extra Corporea
<b>CFD</b>	Computational Fluid Dynamics
<b>CVD</b>	Cardiovascular Disease
<b>DPIV</b>	Digital Particle Image Velocimetry
<b>DTE</b>	Device Trombogenicity Emulation
<b>ECMO</b>	Extra Corporeal Membrane Oxygenation
<b>GFP</b>	Gel Filtered Plasma
<b>HSD</b>	Hemodynamic Shearing Device
<b>MHV<sub>s</sub></b>	Mechanical Heart Valves
<b>PAS</b>	Platelet Activation State
<b>PHVs</b>	Prostetic Heart Valves
<b>PRP</b>	Platelet Rich Plasma
<b>SA</b>	Stress Accumulation
<b>SAMs</b>	Self Assembled Monolayers
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano
<b>UHMWPE</b>	Ultra High Molecular Weight Polyethylene
<b>VAD</b>	Ventricular Assist Device

## SOMMARIO

### 1. Introduzione

Le malattie cardiache e del sistema circolatorio rappresentano la principale causa di morte in Europa e causano ogni anno oltre 4 milioni di decessi [1]. Nonostante i benefici apportati allo stato di salute dei pazienti, i dispositivi medici quali protesi valvolari e ventricoli artificiali o pompe, filtri, ossigenatori e scambiatori di calore utilizzati in applicazioni di cardiocirurgia, ad oggi, non sono in grado di evitare l'insorgenza di problematiche quali l'emolisi, la rottura delle piastrine e la trombogenicità [2, 3]. Storicamente si è sempre data più importanza allo studio dell'emolisi e solo recentemente è stata identificata la necessità di ridurre la trombogenicità dei dispositivi per il trattamento del sangue. Nonostante tutti i dispositivi utilizzati causino l'attivazione piastrinica (attivazione meccanica e/o per contatto) ed il conseguente rischio di fenomeni tromboembolitici, la minimizzazione del potenziale trombogenico associato al loro utilizzo non è un criterio di progettazione utilizzato.

Il presente progetto di tesi, svolto presso il Laboratorio di Micro e

Biofluidodinamica Sperimentale ( $\mu$ BS Lab) del Dipartimento di Elettronica, Informatica e Bioingegneria del Politecnico di Milano, si inserisce all'interno di tale settore di ricerca. Il progetto si avvale della collaborazione di due partners accademici, il gruppo di ricerca dell'Università di Stony Brook di New York e quello dell'Università dell'Arizona, situata a Tucson, e di un partner industriale, la Sorin Group Italia (SGI) di Mirandola, leader mondiale nella progettazione di dispositivi per applicazioni di cardiocirurgia. L'obiettivo generale del presente lavoro è l'ottimizzazione di un protocollo sperimentale per la valutazione del potenziale trombogenico associato ai dispositivi medici per il trattamento del sangue. Il protocollo si basa sull'esecuzione del *Platelet Activation State (PAS) assay*, un saggio chimico in grado di quantificare l'attivazione di un campione piastrinico attraverso la misura della quantità di trombina prodotta in risposta alla stimolazione che esso subisce all'interno dei dispositivi [4]. Il *PAS assay* rappresenta un potente strumento a cui ricorrere nelle fasi progettuali di nuovi dispositivi per il trattamento del sangue, così da ridurre il

potenziale trombogenico e comportare un netto miglioramento dello stato di salute dei pazienti portatori di dispositivi di ausilio alla funzione cardiovascolare.

Durante lo svolgimento del lavoro sono stati eseguiti diversi test volti, in una prima fase, alla definizione delle procedure di esecuzione delle varie fasi che costituiscono l'*assay*, alla preparazione dei reagenti chimici ed alla installazione e collaudo degli strumenti necessari per effettuare il test e, successivamente, a verificare la correttezza delle procedure sperimentali definite attraverso l'analisi della trombogenicità indotta da un particolare modello di ossigenatore neonatale per il sangue (Kids D100, ossigenatore a fasci di fibre cave), prodotto dalla SGI.

## **2.Stato dell'arte**

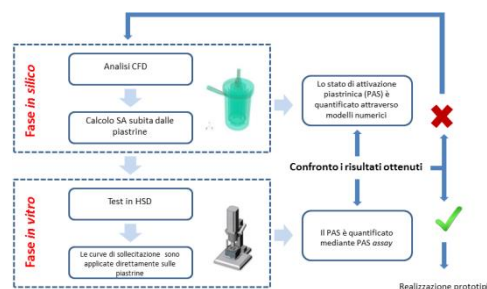
La ricerca nel campo dello studio dell'attivazione piastrinica ha visto nel corso degli anni lo sviluppo di numerosi e differenti approcci: a partire dal 1960 sono stati effettuati studi di tipo sperimentale e/o numerico, attraverso l'utilizzo di differenti metodi e strumenti: Aggregometro di Born, viscosimetro a rotazione, saggi chimici, emoresistometro di Fleisch, citometria a flusso, tecniche

basate sulla *Digital Particle Image Velocimetry* (DIPV), simulazioni di fluidodinamica computazionale (*Computational Fluid Dynamics*, CFD), costituiscono alcuni tra i vari strumenti e metodologie utilizzati per lo studio del fenomeno dell'attivazione piastrinica. Tutte le tecniche sperimentali impiegate nel campo dell'attivazione piastrinica consentivano però di effettuare prevalentemente analisi fenomenologiche, di tipo qualitativo e/o semi-quantitativo: tali analisi si limitavano, infatti, a stabilire l'attivazione o la non attivazione di un campione piastrinico sollecitato ma non erano in grado di determinare, ad esempio, se un tipo di sollecitazione risultasse più trombogenica di un'altra.

Recentemente è stata sviluppata una tecnica innovativa che prende il nome di *Device Thrombogenicity Emulation* (DTE) basato sulla combinazione di metodi numerici e metodi sperimentali [5]. La prima fase prevede, infatti, l'implementazione di modelli numerici basati su simulazioni di CFD che consentono di simulare l'emodinamica all'interno del dispositivo in esame e valutare la storia di carico subita dalle piastrine nel passaggio attraverso il

dispositivo; nella seconda fase, le curve di sforzo ricavate dalle simulazioni sono utilizzate per stimolare *in vitro* le piastrine, utilizzando uno strumento chiamato *Hemodynamic Shearing Device* (HSD), in grado di replicare le curve di carico estratte dall'analisi CFD sul campione piastrinico. Una volta stimulate nell'HSD si procede infine alla misura dell'attivazione delle piastrine attraverso il PAS *assay*.

La DTE permette di effettuare un'analisi di tipo quantitativo, fornendo cioè un indice che consente di confrontare i livelli di trombogenicità associati a diversi dispositivi o a differenti soluzioni progettuali dello stesso dispositivo e pertanto risulta assai utile nelle fasi di progettazione. Tale tecnica inizia oggi ad essere integrata nella fase di progettazione dei dispositivi medici. Il processo è di tipo iterativo: se la trombogenicità del dispositivo è ritenuta accettabile si procede con la realizzazione dei prototipi, altrimenti, in funzione dei risultati ottenuti, si procede alla modifica del disegno e/o di particolari caratteristiche del dispositivo nel tentativo di ridurre ulteriormente il potenziale trombogenico (Figura 2.1) [6].



**Figura 2.1:** Schema a blocchi del processo iterativo seguito nell'analisi DTE.

### 3. Materiali e metodi

Il PAS *assay* è un saggio chimico che si compone di diverse fasi:

1. **Collezione del sangue intero:** il sangue necessario per effettuare l'esperimento è collezionato aggiungendo un agente anticoagulante (acido citrico, citrato, destrosio anidro, ACD-A).
2. **Estrazione del PRP (*Platelet Rich Plasma*):** il sangue intero è sottoposto a centrifugazione per la collezione del solo plasma ricco di piastrine.

Nella preparazione dei campioni che saranno sottoposti a PAS *assay*, è fondamentale assicurarsi che la procedura di centrifugazione eseguita elimini completamente tutti i componenti cellulari del sangue diversi dalle piastrine (che influiscono sul processo dell'attivazione piastrinica e della

coagulazione); allo stesso tempo, tale procedura deve garantire la raccolta di un volume di PRP sufficiente per eseguire l'esperimento (circa 10 ml) con un adeguato valore di concentrazione di piastrinica. Infine, la procedura di centrifugazione non deve indurre attivazione delle piastrine. Di conseguenza, sono state effettuate diverse prove con l'obiettivo di definire un protocollo di centrifugazione adeguato, variando di volta in volta, selettivamente, ciascuno dei parametri che caratterizzano il processo ovvero: i) il valore dell'accelerazione (a), ii) il numero di cicli di centrifugazione successive (N) e iii) il tempo di centrifugazione (t). I diversi protocolli di centrifugazione testati sono riportati in Tabella 3.1:

Protocollo di Centrifugazione	a [g]	t [min]	N
Protocollo 1*	650	5	1
Protocollo 2	850	5	1
Protocollo 3	850	5	2
Protocollo 4	650	10	1
Protocollo 5	650	15	1
Protocollo 6	500	15	1

**Tabella 3.1:** Test di centrifugazione di campioni di sangue intero di origine bovina eseguiti al fine di ottimizzare il protocollo di centrifugazione. Il protocollo 1\* è il protocollo eseguito dai ricercatori americani su campioni di sangue di origine umana.

Per verificare l'efficacia di ciascun protocollo testato sono stati misurati: i) il volume di PRP estratto e ii) la concentrazione piastrinica, tramite l'utilizzo del *Coulter Particle Counter*;

3. **Estrazione del GFP (*Gel Filtered Platelets*):** attraverso l'uso di una colonna per filtrazione su gel il PRP è filtrato in modo da eliminare tutti i componenti proteici presenti nel plasma che andrebbero ad inficiare il buon esito dell'*assay*;

4. **Conta piastrinica:** effettuata per misurare la concentrazione di piastrine nel GFP, al fine di aliquotare correttamente i reagenti da utilizzare nelle fasi successive, è eseguita tramite uno strumento chiamato *Coulter Particle Counter*.

Prima di procedere con gli esperimenti, il *Coulter Particle Counter* è stato opportunamente calibrato: partendo da quanto descritto nel Manuale dello strumento, è stata preparata una soluzione di calibrazione e si è proceduto con la calibrazione dello strumento. Per verificare che la calibrazione fosse stata eseguita in maniera corretta, e che lo strumento fosse in grado di eseguire misure di concentrazioni accurate, sono



state eseguite diverse prove di verifica della calibrazione analizzando diverse soluzioni, ciascuna con un diverso valore di concentrazione;

5. **Preparazione del campione per l'esperimento:** la prima fase consiste nella diluizione del GFP con una soluzione chiamata *platelet buffer* (PB) al fine di ottenere una soluzione piastrinica a concentrazione nota (EXP, con concentrazione  $20 \times 10^3$  piastrine/ $\mu\text{l}$ ); successivamente sono opportunamente addizionate le aliquote dei vari reagenti ( $\text{CaCl}_2$ , Ac-FII, FXa, CH-TH, ecc...) necessari alla quantificazione della trombina prodotta dalle piastrine attivate.

Nella preparazione di tutti i reagenti necessari all'esecuzione del PAS *assay* assume una fondamentale importanza la procedura di acetilazione della protrombina (FII). L'utilizzo della protrombina acetilata è necessario al fine di ottenere una valutazione diretta ed univoca del legame tra la sollecitazione subita dalle piastrine ed il loro livello di attivazione. L'utilizzo della protrombina acetilata elimina infatti il meccanismo di feedback fisiologico: la protrombina fisiologica, *in vivo*, nella sua forma attiva (trombina, FIIa) è a sua volta un potente

attivatore e determina un ulteriore incremento del livello di attivazione delle piastrine.

Il protocollo di acetilazione del FII prevede una procedura che si articola in tre distinte fasi; le prime due fasi consistono in due successive dialisi del FII con due differenti soluzioni dializzanti; al termine delle due dialisi, si procede con l'analisi di verifica dell'avvenuta acetilazione attraverso misura spettrofotometrica dell'Ac-FII.

6. **Sonicazione:** effettuata tramite un sonicatore a sonda, consente di attivare un campione di GFP fino al massimo valore di attivazione ottenibile; in tal modo è possibile valutare (in termini di differenza percentuale rispetto al livello di attivazione del campione sonicato) il livello di attivazione piastrinica del campione oggetto del test.

Sono state eseguite diverse prove di sonicazione di campioni piastrinici al fine di identificare il set di parametri di sonicazione ottimale da adottare nello svolgimento dei test di attivazione piastrinica. L'ottimizzazione del protocollo di sonicazione ha previsto due fasi sperimentali distinte: i) Fase I: determinazione del valore di potenza di

sonicazione; ii) Fase II: individuazione dell'intervallo di tempo ottimale di applicazione dello stimolo.

Il protocollo di sonicazione definito (7W per 10 sec) consente di ottenere il massimo livello di attivazione piastrinica preservando al tempo stesso l'integrità strutturale del campione piastrinico sottoposto a sonicazione.

I risultati ottenuti nei test di sonicazione hanno inoltre permesso di validare le procedure sperimentali adottate per lo svolgimento del PAS *assay*.

**7. Lettura spettrofotometrica:** l'analisi in spettrofotometria costituisce l'ultima fase del protocollo del PAS *assay*. Lo spettrofotometro rileva la dinamica della variazione del valore di assorbanza del campione durante un intervallo di tempo prestabilito. La pendenza della curva (che ha andamento lineare) descrive la variazione di assorbanza nel tempo (Abs\_slope) ed è un indice della quantità di trombina prodotta dal campione, ossia del livello di attivazione dal campione piastrinico in esame.

## 4. Risultati e discussione

### 4.1 Definizione protocollo di centrifugazione

La procedura di centrifugazione cui sono sottoposti i campioni di sangue bovino intero garantisce la separazione fisica tra il PRP e le altre componenti ematiche. La procedura di centrifugazione è considerata efficace nel momento in cui:

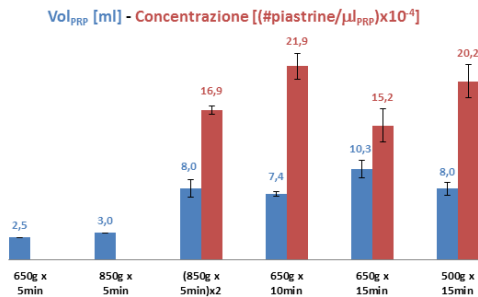
- i) assicura che il PRP ottenuto non presenti al suo interno residui di altre cellule ematiche;
- ii) consenta di collezionare un volume di PRP sufficiente per eseguire l'esperimento, ovvero circa 10 ml, con una adeguata concentrazione piastrinica;
- iii) non attivi le piastrine a causa della sollecitazione meccanica indotta dall'accelerazione imposta dallo strumento.

I risultati delle differenti prove di centrifugazione effettuate sono riassunti nella Tabella 4.1 e in Figura 4.1:

Protocollo di Centrifugazione	a[g]	t[min]	N	#Campioni	Volume [ml]	Concentrazione [[#piastrine/ $\mu$ lPRP] $\times 10^9$
Protocollo 1*	650	5	1	1	2.5	nd
Protocollo 2	850	5	1	1	3.0	nd
Protocollo 3	850	5	2	2	8.0 $\pm$ 1.0	16.4 $\pm$ 0.2
Protocollo 4	650	10	1	4	7.4 $\pm$ 0.2	21.9 $\pm$ 1.4
Protocollo 5	650	15	1	4	10.2 $\pm$ 0.1	15.2 $\pm$ 1.9
Protocollo 6	500	15	1	4	8.0 $\pm$ 0.7	20.2 $\pm$ 1.9

**Tabella 4.1:** Valori medi  $\pm$  deviazione standard di volume di PRP e concentrazione di piastrine/ $\mu$ l<sub>PRP</sub> (cinque letture per ciascun campione) calcolati per ciascuno dei diversi protocolli di centrifugazione testati. nd: indica misura di

concentrazione non eseguita dato il valore di Vol di PRP molto basso.



**Figura 4.1:** Volume di PRP e concentrazione di piastrine/ $\mu$ l<sub>PRP</sub> ottenuti a seguito delle diverse procedure di centrifugazione.

L'analisi dei dati di Figura 4.1 indica che i protocolli 1\* e 2 non garantiscono una separazione efficace del sangue; I protocolli 3-6 forniscono invece dei risultati validi in termini di Vol di PRP ottenuto; con l'obiettivo però di identificare un protocollo cautelativo in termini di sollecitazione indotta sulle piastrine, si è deciso di utilizzare il protocollo 6 come protocollo definitivo per i nostri esperimenti. Il protocollo 6 prevede infatti l'applicazione di un solo ciclo di centrifugazione ( $N_6 = 1$ ) al più basso valore di accelerazione ( $a_6 = 500g$ ) tra quelli testati. Per quanto riguarda il tempo di centrifugazione ( $t_6 = 15$  min), questo non determina un maggiore stress

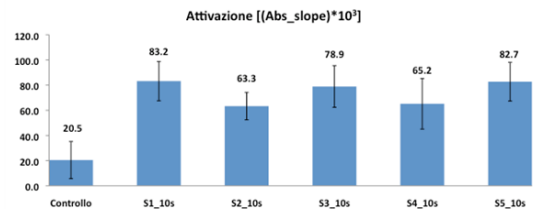
per le piastrine, che sono invece molto più sensibili al valore di a.

## 4.2 Definizione del protocollo di sonicazione dei campioni

La definizione del protocollo di sonicazione ha previsto l'esecuzione di due fasi sperimentali distinte, attraverso cui determinare:

1. Fase I: valore del livello di potenza ottimale della sonicazione;
2. Fase II: intervallo di tempo ottimale di applicazione dello stimolo.

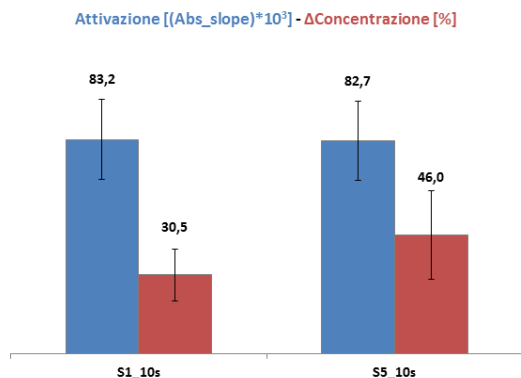
Nella Fase I sono stati testati diversi protocolli i cui risultati, in termini di attivazione piastrinica (Abs\_slope), sono riportati in Figura 4.2:



**Figura 4.2:** Valori di attivazione piastrinica (Abs\_slope) dei campioni piastrinici sottoposti a procedure di sonicazione caratterizzate da stessa durata dello stimolo (10 sec) ma differente livello di potenza.

Dall'analisi della Figura 4.2, si nota che i valori maggiori sono stati ottenuti tramite i protocolli S1\_10s ( $83.2 \pm 15.6$ ) e S5\_10s ( $82.7 \pm 15.4$ ) e pertanto si è proceduto a misurare la concentrazione piastrinica dei

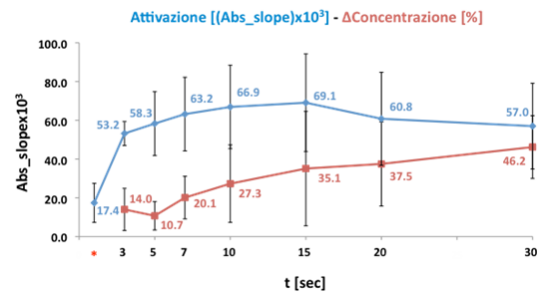
campioni sottoposti a queste procedure di sonicazione. È stata quindi valutata la differenza percentuale ( $\Delta$ Concentrazione) tra la concentrazione del campione prima e dopo la sonicazione in modo da assicurarsi che la stimolazione applicata non avesse danneggiato le piastrine comportandone la rottura. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 4.3. È possibile osservare dalla Figura 4.3 come, a parità di attivazione piastrinica, il protocollo S5\_10s causi la rottura di circa il 46% delle piastrine presenti nel campione contro il 30% osservato per il protocollo S1\_10s. La scelta del livello di potenza ricade quindi sul protocollo S1 (7W).



**Figura 4.3:** Valori di Abs\_slope e  $\Delta$ Concentrazione misurati nei campioni sottoposti ai protocolli di sonicazione S1\_10s e S5\_10s.

Nella Fase II fissato il livello di potenza di sonicazione a 7 W (S1), sono stati quindi testati diversi protocolli caratterizzati da tempi di durata dello

stimolo differenti (da 3 a 30 secondi). I risultati sono riportati in Figura 4.4:



**Figura 4.4:** Valori di Abs\_slope e  $\Delta$ Concentrazione % misurati nei campioni sottoposti a protocolli di sonicazione di durata variabile, a parità di potenza dello stimolo (S1 = 7W); \* indica il campione di controllo (non sonicato).

Come mostrato in Figura 4.4, il valore di Abs\_slope cresce con il crescere della durata dello stimolo, fino ad un valore di tempo di applicazione dello stimolo pari a 15 sec. Oltre i 15 sec l'attivazione piastrinica inizia a diminuire, indice di un progressivo danneggiamento delle piastrine sonicate, come confermato dai valori di  $\Delta$ Concentrazione per i quali si osserva un trend di incremento continuo all'aumentare del tempo di esposizione dello stimolo.

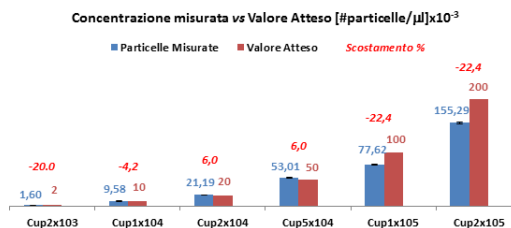
Questa seconda fase sperimentale ha consentito perciò di definire come la durata di applicazione ottimizzata dello stimolo sia pari a 10 sec, valore che consente di ottenere un elevato valore di

attivazione senza danneggiare eccessivamente le piastrine sonicate.

### 4.3 Calibrazione del *Coulter Particle Counter*

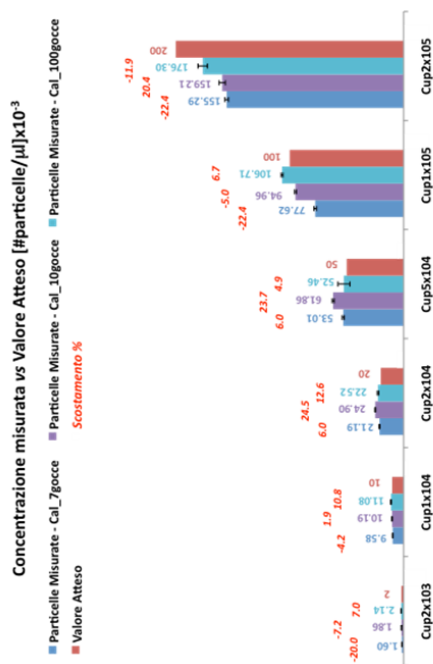
La soluzione utilizzata per la calibrazione dello strumento è una sospensione di particelle di Orgasol (diametro pari a  $10 \pm 2 \mu\text{m}$ ) all'interno di una soluzione elettrolita (soluzione fisiologica). Preparata la soluzione di Orgasol (con concentrazione delle particelle di  $2 \times 10^6$  particelle/ml) è stata preparata la soluzione di calibrazione disperdendo 7 gocce della soluzione di Orgasol di in 20 ml di soluzione fisiologica ( $\text{Cal}_{7\text{gocce}}$ ) e si è proceduto a calibrare lo strumento. Per verificare che la calibrazione fosse stata eseguita in maniera corretta, e che lo strumento fosse in grado di eseguire misure di concentrazioni accurate, sono state analizzate 6 diverse soluzioni di Orgasol, ciascuna con un diverso valore di concentrazione. Per ciascuna delle soluzioni sono state effettuate cinque letture ed i risultati ottenuti sono stati mediati e confrontati poi con il valore atteso, ovvero il valore di concentrazione, noto, della soluzione preparata e testata.

I risultati sono riportati nella Figura 4.5:



**Figura 4.5:** Risultati della verifica della procedura di calibrazione del *Coulter Particle Counter* effettuata con la soluzione  $\text{Cal}_{7\text{gocce}}$ . In figura, per ciascuna delle soluzioni testate, sono riportati i valori di scostamento % (in rosso) tra i dati forniti dallo strumento (particelle misurate) ed i valori attesi.

I risultati ottenuti indicano (Figura 4.5) come lo scostamento percentuale tra i valori misurati dallo strumento ed i valori attesi non sia affatto trascurabile per alcune delle soluzioni testate. Si è pertanto deciso di ricalibrare lo strumento con altre due soluzioni di calibrazione:  $\text{Cal}_{10\text{gocce}}$  e  $\text{Cal}_{100\text{gocce}}$  ottenute disperdendo, rispettivamente, 10 e 100 gocce di Orgasol in 20 ml di soluzione fisiologica. In entrambi i casi, al termine della procedura di calibrazione, sono state poi nuovamente analizzate le 6 soluzioni a concentrazione nota. I risultati sono riportati in Figura 4.6:



**Figura 4.6:** Risultati della verifica della procedura di calibrazione del *Coluter Particle Counter* effettuata con le soluzioni Cal<sub>7gocce</sub>, Cal<sub>10gocce</sub> e Cal<sub>100gocce</sub>. Per ciascuna delle soluzioni testate, sono riportati i valori di scostamento % (in rosso) tra i dati forniti dallo strumento (particelle misurate) ed i valori attesi.

La misura della concentrazione più rilevante ai fini dell'esecuzione del PAS *assay* è quella che riguarda la soluzione EXP: è fondamentale, infatti, che la concentrazione del campione sia il più prossima possibile a  $20 \times 10^3$  piastrine/ $\mu\text{l}$  al fine di aliquotare opportunamente i reagenti per l'*assay*. La calibrazione che, nell'intorno del valore di nostro interesse (concentrazione dell'EXP), presenta uno scostamento percentuale minore rispetto al valore atteso, e che quindi consente di avere risultati più accurati è la Cal<sub>7gocce</sub>.

Questa soluzione è quindi stata usata per calibrare lo strumento.

#### 4.4 Acetilazione della protrombina

Il processo di acetilazione è svolto in tre diverse fasi al termine delle quali è analizzata, attraverso uno spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 280 nm, l'assorbanza ( $A_{280}$ ) del campione FII acetilato (Ac-FII).

Dal valore di  $Abs_{280}$  si calcola poi la concentrazione molare (C) dell'Ac-FII attraverso l'equazione 4.1:

$$C = net A_{280} / (1.30 \times 0.072) \quad (\text{eq. 4.1})$$

e si verifica che il suo valore sia prossimo a  $10 \mu\text{M}$  (valore di C dell'Ac-FII).

Il valore ottenuto al termine della procedura di acetilazione effettuata è pari a  $7.77 \pm 0.01 \mu\text{M}$ , risultato che conferma quindi l'avvenuta acetilazione del FII. Tale risultato garantisce la consistenza di tutti i dati ottenuti nell'ambito del presente lavoro di tesi.

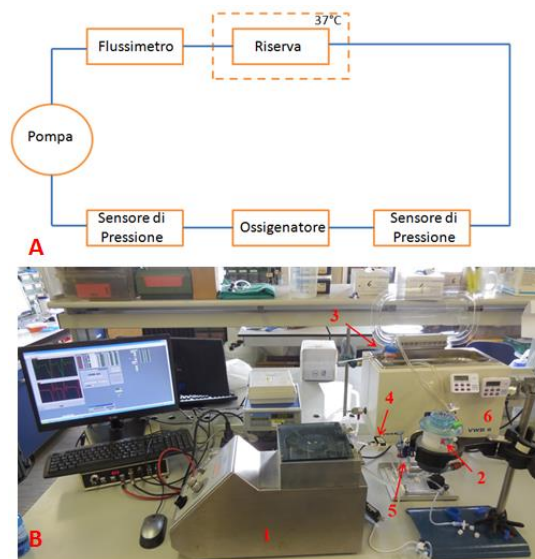
#### 5. Applicazione del PAS *assay*: studio della trombogenicità di due differenti modelli di ossigenatori neonatali

Dopo aver definito il protocollo per l'esecuzione del PAS *assay*, è stato

condotto uno studio mirato alla valutazione del rischio trombotico associato al Kids D100, ossigenatore a fibre cave prodotto dalla SGI. Nello specifico, i test effettuati hanno avuto l'obiettivo di confrontare il livello di attivazione piastrinica indotto dall'utilizzo di:

- i) ossigenatori costituiti da fibre polimeriche "nude" - ossia prive di trattamento superficiale anti-trombotico
- ii) ossigenatori dotati di fibre polimeriche rivestite con fosforilcolina, al fine di verificare l'effettivo potenziale di questa molecola nel ridurre i fenomeni di adesione piastrinica e il conseguente rischio di formazione di trombi.

Il set-up sperimentale realizzato per tale studio (Figura 5.1) riproduce le condizioni tipiche di utilizzo dell'ossigenatore durante gli interventi chirurgici in regime di circolazione extracorporea (CEC):



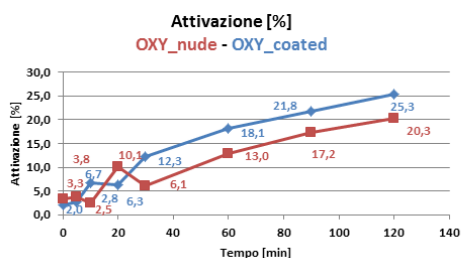
**Figura 5.1** Rappresentazione schematica del circuito (A); Set-up sperimentale (B) utilizzato per l'analisi del rischio trombotico associato agli ossigenatori neonatali Kids D100:1. Pompa Roller, 2. Riserva, 3. Bagno temostatico, 4. Ossigenatore.

Negli esperimenti condotti è stato utilizzato sangue di origine ovina, prelevato da animale vivo presso una fattoria locale, facendo uso di una sacca per il sangue (Terumo Blood Bags - CPDA - 1). Dopo aver ottenuto il GFP si è proceduto al riempimento e debellamento del circuito; avviata poi la pompa Roller, si è proceduto con il prelievo dei campioni piastrinici a tempi (t) predefiniti (t = 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 minuti): tali campioni piastrinici stimolati sono stati poi sottoposti alla lettura spettrofotometrica, al fine di valutare la dinamica di attivazione delle piastrine all'aumentare del tempo di

residenza nel circuito ossia al numero di passaggi all'interno dell'ossigenatore.

Al termine dell'analisi spettrofotometrica il grado di attivazione di ciascun campione (campioni di controllo - non stimolati -, campioni sonicati e campioni prelevati dal circuito) è valutato in funzione del valore Abs\_slope. Ricavato il valore di attivazione di ogni campione è stato poi calcolato il valore di Attivazione % normalizzando i dati rispetto al valore di attivazione dei campioni sonicati.

I risultati ottenuti testando i due differenti ossigenatori sono riportati in Figura 5.2:



**Figura 5.2** Attivazione % dei campioni piastrinici misurata nel corso dell'esperimento.

Dal grafico di Figura 5.2 si può comprendere che:

- i) in entrambi gli esperimenti, il PAS assay è stato in grado di discriminare un aumento dell'attivazione piastrinica all'aumentare del numero di passaggi dei campioni

piastrinici all'interno dell'ossigenatore;

- ii) i risultati di attivazione piastrinica ottenuti nei due esperimenti pilota mostrano come il livello di attivazione piastrinica associato all'ossigenatore con fibre "nude" e con fibre ricoperte da fosforilcolina risultano confrontabili.

E' possibile quindi concludere che:

- i) questi esperimenti verificano la correttezza dei protocolli sperimentali definiti durante tale lavoro e la correttezza delle procedure sperimentali svolte per l'esecuzione del PAS;
- ii) nonostante non sia possibile possa trarre delle conclusioni, visto il numero residuo di esperimenti condotti, l'ottenimento di livelli di attivazione piastrinica confrontabili porta a pensare che l'attivazione possa non essere solo dovuta al contatto con le fibre ma che risulti una combinazione di effetti tra



attivazione da contatto e attivazione meccanica, quest'ultima generata dalla sollecitazione imposta alle piastrine all'interno del circuito idraulico. In funzione quindi di questi risultati preliminari, occorrerà prevedere delle modifiche del protocollo di prova al fine di ridurre la sollecitazione delle piastrine e conseguentemente il contributo dovuto all'attivazione meccanica.

## 6. Conclusioni e sviluppi futuri

L'obiettivo generale del presente lavoro di tesi è stato l'ottimizzazione di un protocollo sperimentale per la valutazione del rischio trombogenico associato ad alcune classi di dispositivi biomedicali per il trattamento del sangue. Il protocollo è basato sull'analisi dell'attivazione piastrinica *in vitro* attraverso il PAS *assay*, un saggio chimico in grado di quantificare il livello di trombina prodotta dalle piastrine a seguito della loro attivazione.

Nel perseguire l'obiettivo di ottimizzazione dei protocolli sperimentali

per condurre il PAS *assay* è stata posta grande attenzione a ciascuna delle fasi del lavoro svolto durante il presente progetto di tesi: i) studio dei meccanismi biologici alla base del fenomeno di attivazione piastrinica, ii) analisi dei protocolli originali provenienti dai ricercatori dell'Università di Stony Brook, iii) preparazione dei reagenti chimici necessari per l'esecuzione dei test, iv) messa in funzione e collaudo degli strumenti richiesti per l'esecuzione dell'*assay*, ed v) ottimizzazione dei protocolli sperimentali.

Nonostante le criticità incontrate, la metodologia di analisi che è stata adottata ha portato alla risoluzione di ciascuna di esse e ha consentito di definire un protocollo in cui, in ciascuna fase, ciascun parametro è stato definito in funzione di un'attenta analisi del suo effetto. I test e le prove effettuati successivamente hanno confermato il raggiungimento dell'obiettivo prefissato all'inizio del presente lavoro.

Il PAS *assay* così definito rappresenta un potente strumento in grado non solo di evidenziare delle differenze nel livello di attivazione delle piastrine sottoposte ai diversi protocolli di sonicazione descritte

all'interno di questo elaborato, ma è anche, e soprattutto, in grado di contribuire allo studio e all'analisi della trombogenicità associata a diversi dispositivi per il trattamento del sangue, come dimostrato dai test effettuati con i due differenti modelli di ossigenatori neonatali.

Il principale sviluppo futuro delle attività condotte nell'ambito del presente lavoro nasce come conseguenza diretta dei risultati ottenuti durante le ultime fasi del lavoro stesso, ossia l'analisi della trombogenicità indotta dai due modelli di fibra (nuda e rivestita con fosforilcolina) contenute nei due differenti ossigenatori testati. I risultati ottenuti finora non mostrano differenze statisticamente significative del grado di attivazione delle piastrine sottoposte al ripetuto passaggio attraverso i due differenti modelli di ossigenatore. L'ipotesi avanzata è che l'attivazione indotta sia provocata da una combinazione di effetti prodotti dall'attivazione da contatto e dall'attivazione meccanica. Per poter discriminare i due effetti sarà necessario svolgere quindi ulteriori test replicando le condizioni sperimentali degli esperimenti finora condotti ma variando alcuni parametri di processo al fine di ridurre la

sollecitazione meccanica indotta all'interno del circuito idraulico utilizzato per il test, variando, ad esempio, la portata imposta dalla pompa.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P, Rayner M (2012), *European Cardiovascular Disease Statistics 2012*. European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis.
- [2] Kidane AG, Burriesci G, Cornejo P, Dooley A, Sarkar S, Bonhoeffer P, Edirisinghe M and Seifalian AM (2009), *Current Developments and Future Prospects for Heart Valve Replacement Therapy*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 88 (1): 290-303.
- [3] Massel D, Little SH (2001), *Risks and Benefits of Adding Anti-platelet Therapy to Warfarin among Patients with Prosthetic Heart Valves: a Meta-analysis*. *J Am Coll Cardiol* 37 (2): 569-578.

[4] Jesty J and Bluestein D (1999), *Acetylated Prothrombin as a Substrate in the Measurement of the Procoagulant Activity of Platelets: Elimination of the Feedback Activation of Platelets by Thrombin*. *Analytical Biochemistry* 272: 64-70.

[5] Bluestein D, Einav S, Slepian MJ (2013), *Device Thrombogenicity Emulation: A Novel Methodology for Optimizing the Thromboresistance of Cardiovascular Devices*. *Journal of biomechanics* 46: 338-344.

[6] Pelosi A,; *Design Optimization and Thrombogenicity Evaluation of Blood Recirculating Devices for Cardiopulmonary Bypass*. Tesi di dottorato, Politecnico di Milano, Dipartimento di Bioingegneria, 2013.

## **ABSTRACT**

### **Introduction**

Cardiovascular diseases (CVDs) represent the major cause of death in Europe and they cause over 4 million deaths every year [1]. Despite the benefits to patients' health, medical devices such as prosthetic heart valves and artificial ventricles or pumps, filters, oxygenators and heat exchangers used in cardiac applications are not able to prevent complications such as hemolysis, breaking of platelets, and thrombogenicity[2, 3]. Historically it has always been given more importance to the study of hemolysis. Nowadays the importance to reduce blood thrombogenicity handling devices has been identified. All devices cause platelet activation (mechanical and / or contact activation) and the consequent risk of thromboembolic phenomena. In spite of this complications, the minimization of thrombogenic potential associated with their use is not used as a design criterion.

This thesis project, carried out at the Laboratory of Micro and Experimental Biofluidodinamica ( $\mu$ BS Lab), Department of Electronics, Informatics

and Bioengineering of the Politecnico di Milano, fits within this field of research. The project has two academic partners, the research groups of Stony Brook University in New York and the University of Arizona, located in Tucson, and an industrial partner, the Italian Sorin Group (SGI) Mirandola.

The objective of this work is the optimization of an experimental protocol for the evaluation of thrombogenic potential associated with blood handling devices. The specific aim of this thesis is the optimization of an experimental protocol for the implementation of PAS assay –a chemical assay based on the modified prothrombinase method- on stimulated platelet samples [4]. Tests and trial have been carried out in order to confirm the potentiality and sensitivity of this technique, which may represent a powerful tool to use in the design phase of new blood handling devices, in order to reduce the thrombogenic potential associated to devices. The use of this technique will lead to an improvement of the health status of patients, who can reduce or even eliminate the anticoagulant therapies.

In a first step several tests were carried out to define the PAS assay experimental protocol: all chemical reagents were prepared and all the instruments were installed. In the second step, thrombogenicity induced by a particular model of blood neonatal oxygenator (Kids D100 oxygenator bundles of hollow fibers), produced by the Italian Sorin Group (SGI), is analyzed to verify the correctness of the experimental defined procedures.

## 2. State of the art

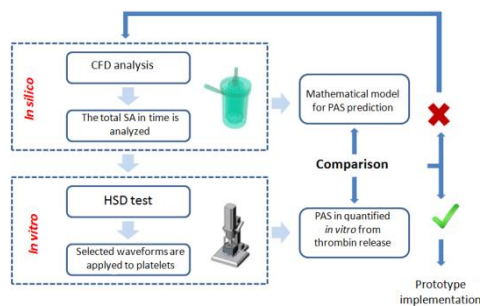
The research field in platelet activation study seen over the years the development of different approaches: since 1960 experimental and/or numerical studies have been performed through the use of different methods and tools, and more recent studies are based on the combination of these two approaches. Born aggregometer, rotational viscosimeter, chemical assay, Fleisch hemoresistometer, flow cytometry, Digital Particle Image Velocimetry (DPIV) based technique, computational fluid dynamics (CFD) represent some of the various tools and methodologies used in the study of platelet activation. All the

experimental techniques allowed to carry predominantly phenomenological, quantitative or semiquantitative analysis. These analyzes established the activation or the non-activation of stimulated platelet samples but were not able to determine if a specific stress was more thrombogenic to another. Recently, wesome researches developed a novel technique defined as Thrombogenicity Device Emulation (DTE) based on a combination of numerical and experimental methods [5]. Numerical results obtained from CFD simulations are used to simulate the hemodynamics within the device and to evaluate stress history of each platelet after repeat recirculation within the device. After CFD analysis, stress trajectories are used to stimulate platelets in vitro, using an Hemodynamic Shearing Device (HSD), an instrument capable of replicating the load curves extracted from the analysis CFD..Then the level of stimulated platelets activation is quantified by using PAS assay.

DTE technique allows to perform quantitative analysis providing an index that allows to compare thrombogenicity associated with different devices or different design solutions of the same

device. DTE is very useful in the design phase of blood handling devices to minimize thrombogenic potential associated to these devices.

DTE follows an iterative process: if device thrombogenicity is acceptable, prototypes will be constructed, otherwise, depending on the results obtained, device design will be modified (Figure 2.1) [6].



**Figure 2.1:** Schematic representation of DTE iterative process.

### 3. Materials and methods

The PAS assay is composed of several phase:

1. **Blood collection:** the blood is collected by adding an anticoagulant agent (citric acid, citrate, anhydrous dextrose, ACD-A).

2. **PRP (Platelet Rich Plasma) extraction:** whole bovine blood is

centrifuged using a centrifuge (Sigma 3-15, Sigma Centrifuge) for the collection of platelet rich plasma. Centrifugation i) must separate platelets from all other cellular blood components (which affect the process of platelet activation and coagulation) and ii) this procedure should ensure the collection of a sufficient volume of PRP to perform the experiment (approximately 10 ml) with an appropriate platelet concentration and iii) centrifugation procedure must not induce platelet activation. Consequently, starting from the original protocols given us by Stony Brook University, various tests were carried out with the aim of defining a centrifugation protocol, varying selectively, each of the parameters characterizing the process: i) the acceleration value ( $a$ ), ii) the number of centrifugation subsequent cycles ( $N$ ) and iii) the centrifugation time ( $t$ ). The different centrifugation protocols are reported in Table 3.1:

Centrifugation Protocol	$a$ [g]	$t$ [min]	$N$
Protocol 1*	650	5	1
Protocol 2	850	5	1
Protocol 3	850	5	2
Protocol 4	650	10	1
Protocol 5	650	15	1
Protocol 6	500	15	1

**Table 3.1:** Test of bovine blood centrifugation performed in order to optimize centrifugation

protocol. Protocol 1\* is the protocol executed by the American researchers on human blood.

To check the effectiveness of each protocol tested, volume of PRP and platelet concentration were measured;

3. **GFP (Gel Filtered Platelet) extraction:** using a column (Aqueous chromatography column, Spectra / Chrom) for gel filtration (Sephacrose 2B, Sigma Aldrich) PRP is filtered to eliminate all protein components of plasma;

4. **Platelet count:** GFP were counted using the *Coulter Particle Counter* to measure platelet concentration to aliquote necessary reagents. The *Coulter Particle Counter* has been properly calibrated: starting from the manual of the instrument, we have prepared a calibration solution and we proceeded with the calibration of the instrument. To verify calibration procedure, various tests were performed and several solution with different concentration were analyzed;

5. **Sample preparation:** GFP is initially diluted with *platelet buffer* (PB) to prepare a platelet solution of known concentration ( $20 \times 10^3$  platelets/ $\mu$ l). Then reagents (CaCl<sub>2</sub>, Ac-FII, FXa, CH-TH,

ecc...) necessary to quantify thrombin produced by activated platelets are appropriately added. The prothrombin (FII) acetylation is a very important procedure. The use of acetylated prothrombin is necessary to obtain a direct link between mechanical stresses and platelet activation: physiological prothrombin, in its active form (thrombin, FIIa) is a potent activator and it determines a further increase of platelet activation.

Prothrombin acetilation is a three days procedure: in the first two phases (day 1 and day 2), FII is dialyzed with two different dialysing solutions; then on day 3 there is the verification analysis of correct acetylation through spectrophotometric measurement of FII absorbance at 280nm.

6. **Sonication:** is carried out using a probe sonicator (BANDELIN Sonopuls, HD 2070). Sonication is used to activate a GFP sample to the maximum value of obtained activation; thus it is possible to evaluate (in terms of percentage difference compared to the sonicated sample activation) the platelet activation level of the sample object of the test. Several sonication tests of samples were

performed to identify the optimal set of sonication. The optimization of sonication protocol has provided two distinct experimental phases: i) Step I: determination of the power value ii) Step II: identification of the optimal time sonication.

The defined sonication protocol (7W per 10 sec) achieves the highest level of platelet activation preserving the structural integrity of sonicated platelets. The results obtained in sonication tests have also allowed us to validate the PAS assay experimental procedures.

7. **Spectrophotometric analysis:** is the last step of the PAS assay. The spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan FC) detects the dynamics of change in the absorbance value of the sample during a predetermined time interval. The slope of the curve (which has linear trend) describes the change in absorbance over time (Abs\_slope) which is an index of the amount of thrombin produced by the sample.

## 4. Results

### 4.1 Centrifugation protocol

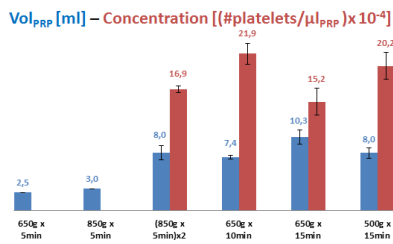
Centrifugation procedure of bovine blood provides physical separation between PRP and other blood components. Centrifugation procedure is considered effective when: i) ensures that the PRP obtained not present inside residues of other blood cells; ii) allows to collect a volume of PRP sufficient to perform the experiment ( about 10 ml), with an adequate platelet concentration; iii) non-actives platelets due to the mechanical stress induced by the acceleration imposed by the instrument.

The results of centrifugation tests are shown in Table 4.1 and in Figure 4.1:

Centrifugation Protocol	$\omega$ [g]	$t$ [min]	N	#Samples	Vol <sub>PRP</sub> [ml]	Concentration [(platelet/ $\mu$ lPRP) $\times 10^{-3}$ ]
Protocol 1*	650	5	1	1	2.5	nd
Protocol 2	850	5	1	1	3.0	nd
Protocol 3	850	5	2	2	8.0 $\pm$ 1.0	16.4 $\pm$ 0.2
Protocol 4	650	10	1	4	7.4 $\pm$ 0.2	21.9 $\pm$ 1.4
Protocol 5	650	15	1	4	10.2 $\pm$ 0.1	15.2 $\pm$ 1.9
Protocol 6	500	15	1	4	8.0 $\pm$ 0.7	20.2 $\pm$ 1.9

**Table 4.1:** Average values  $\pm$  standard deviation of volume and concentration of PRP (platelet/ $\mu$ lPRP) for each of the different centrifugation protocols tested. nd: indicates concentration measurement has not been performed since the value of Vol PRP very low.





**Figure 4.1:** Volume of PRP and platelet concentration obtained following various procedures of centrifugation.

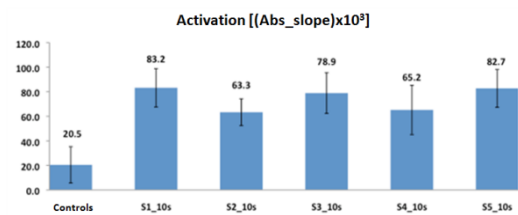
The analysis of the data in Table 4.1 indicates that Protocols 1 and 2 \* do not guarantee an effective separation of blood; protocols 3-6 provide valid results in terms of volume of PRP. With the goal to identify a precautionary protocol in terms of stress induced on platelets, it was decided to use the protocol 6 as final protocol for our experiments. This protocol is a single centrifugation procedure ( $N_6=1$ ), the value of acceleration used is the lowest ( $a_6=500g$ ) among those tested. The centrifugation time ( $t_6=15$  min) does not cause an increased stress to the platelets, which are much more sensitive to the value of  $a$ .

#### 4.2 Sonication protocol

To define the sonication protocol, two experimental phases were performed in order to determine:

1. Phase I: the value of the optimal sonication power level;
2. Phase II: optimal time of stimulus application.

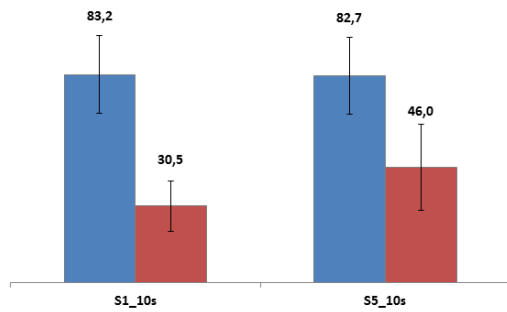
In Phase I, several protocols have been tested and the results, in terms of platelet activation (Abs\_slope), are shown in Figure 4.2:



**Figure 4.2:** Values of platelet activation (Abs\_slope) of platelet samples subjected to sonication procedures characterized by the same duration of the stimulus (10 sec) but different power level.

From the analysis of Figure 4.2, we note that higher values were obtained through protocols S1\_10s ( $83.2 \pm 15.6$ ) and S5\_10s ( $82.7 \pm 15.4$ ). So we proceeded to measure platelet samples concentration: it was then evaluated the percentage difference ( $\Delta$ Concentrazione) between sample concentration before and after sonication to make sure that the stimulation applied had not damaged platelets, leading to its rupture. The results obtained are shown in Figure 4.3:

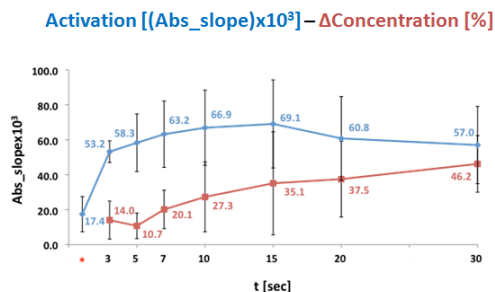
Activation  $[(\text{Abs\_slope}) \times 10^3] - \Delta\text{Concentration} [\%]$



**Figure 4.3:** Values of Abs\_slope and ΔConcentration measured in the samples subjected to sonication protocols S1\_10s and S5\_10s.

It is possible to observe as, for equal platelet activation, the protocol S5\_10s cause the rupture of approximately 46% of the platelets present in the sample against the 30% observed for the protocol S1\_10s. The power level chosen is S1 (7W).

In Phase II different protocols characterized by the same power level (S1) but from different stimulus duration times (from 3 to 30 seconds) were tested. The results are shown in Figure 4.4:



**Figure 4.4:** Values of Abs\_slope and ΔConcentration% measured in samples

subjected to sonication protocols of variable length, with an equal power of the stimulus (S1 = 7W); \* Indicates the control sample (not sonicated).

As shown in Figure 4.4, the value of Abs\_slope increases with the increase of the duration of the stimulus, up to a value of time of application of the stimulus equal to 15 sec. Over 15 sec platelet activation begins to decrease, indicating a progressive damage of sonicated platelets, as confirmed by the values of ΔConcentrazione for which it is observed a trend of continuous increase with increasing time of exposure of the stimulus.

This second experimental phase has allowed to define that 10 sec is the optimal duration of application of the stimulus. This duration allows to obtain a high activation value without excessively damaging the sonicated platelets.

### 4.3 Calibration of Coulter Particle Counter

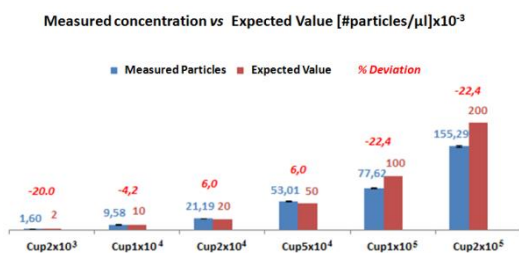
The solution used for instrument calibration is a solution of Orgasol particles (diameter equal to  $10 \pm 2\mu\text{m}$ )

suspended within an electrolyte solution (saline).

The initial Orgasol solution (with particle concentration of  $2 \times 10^6$  particles/ml) was prepared. Then we prepared a calibration solution by dispersing 7 drops of the Orgasol solution in 20 ml of saline ( $\text{Cal}_{7\text{gocce}}$ ) and we proceeded to calibrate the instrument.

To verify that the calibration had been correctly performed, and that the instrument was capable of performing accurate measurements of concentrations, 6 different Orgasol solutions were analyzed, each with a different concentration value. For each of the solutions five readings were made and the results obtained were averaged and compared with the expected value.

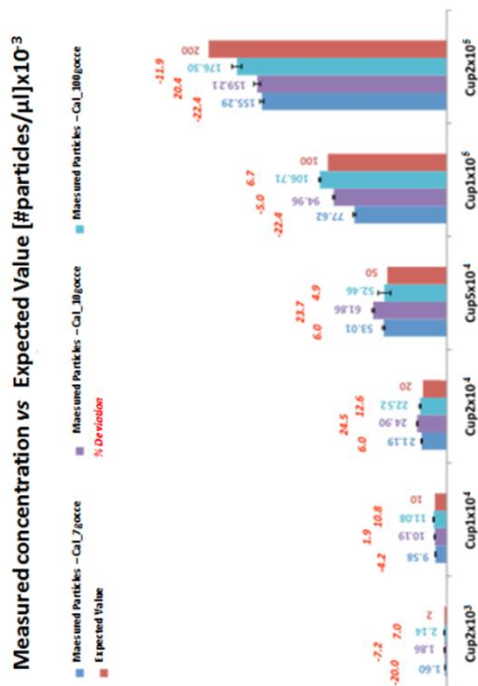
The results are shown in Figure 4.5:



**Figure 4.5:** Verification of the *Coulter Particle Counter* calibration performed with the solution  $\text{Cal}_{7\text{gocce}}$ . In the figure, for each of the tested solutions, the values of deviation% (in red) between the data provided by the instrument

(measured particles) and the expected values is shown.

The results obtained indicate that the percentage deviation between values measured by the instrument and the expected values is certainly not negligible for some of tested solutions. It was therefore decided to re-calibrate the instrument with two other calibration solutions:  $\text{Cal}_{10\text{gocce}}$  and  $\text{Cal}_{100\text{gocce}}$  respectively obtained by dispersing 10 and 100 drops of Orgasol in 20 ml of saline. In both cases, at the end of calibration procedure, the 6 solutions of known concentration used in the verification of the first calibration procedure were analyzed. The results are shown in Figure 4.6:



**Figure 4.6:** Results of the verification of *Coulter Particle Counter* calibration procedure performed with solutions Cal7gocce, Cal10gocce and Cal100gocce. For each of the tested solutions, the values of deviation % (in red) between the data provided by the instrument (measured particles) and the expected values are shown.

The more relevant concentration measurement to the implementation of the PAS assay is the measure of EXP concentration: it is essential that EXP concentration is as close as possible to  $20 \times 10^3$  platelet/ $\mu\text{l}$  in order to correctly aliquot assay reagents. The calibration that, in the range of the value of our interest (concentration EXP= $20 \times 10^3$  platelets/ $\mu\text{l}$ ), allows for more accurate

results is the Cal<sub>7gocce</sub>. This solution was then used to calibrate the instrument.

#### 4.4 Prothrombin acetylation

The acetylation process is carried out in three different phase at the end of which the absorbance (A<sub>280</sub>) of the FII acetylated sample (Ac-FII) is analyzed through a spectrophotometer, at a wavelength of 280 nm. From A<sub>280</sub> value, molar concentration (C) of Ac-FII is then calculated by equation 4.1:

$$C = \text{netAbs}_{280} / (1.30 \times 0.072) \quad (\text{eq. 4.1})$$

Then we verify that its value is close to 10  $\mu\text{M}$  (C of Ac-FII). The obtained value of the acetylation procedure is equal to  $7.77 \pm 0.01 \mu\text{M}$ , a result that confirms the successful acetylation of the FII. This result ensures the consistency of data in the context of this thesis work.

#### 5. Application of the PAS assay: study of thrombogenicity of two different models of neonatal oxygenators

After PAS assay protocol definition, we conducted a study for the evaluation of thrombogenic risk associated with a

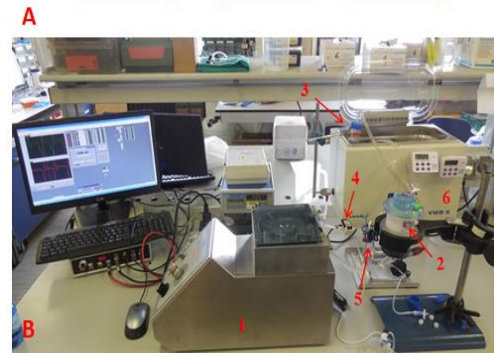
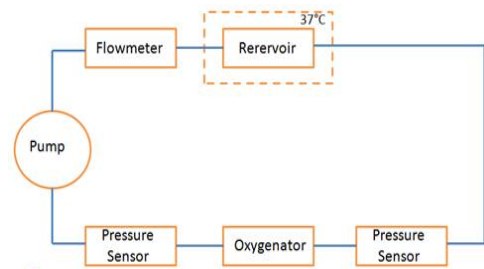
neonatal oxygenator, the Kids D100, an hollow fibers oxygenator produced by SGI. Specifically, the tests had the objective to compare the level of platelet activation induced by the use of:

- i) oxygenators made of polymeric “nude” fibers - ie without anti-thrombogenic surface treatment;
- ii) oxygenators with polymeric fibers coated by phosphorylcholine;

The specific aim was to verify the effective potential of this molecule in reducing of platelet adhesion phenomena and platelet aggregation and the consequent risk of thrombus formation. The Kids D100 neonatal oxygenator, at nominal flow rate of 500 ml/min, transfer 34 ml/min of O<sub>2</sub> and 23 ml/min of CO<sub>2</sub> to compensate for the metabolic demand of the patient. The exchange area is appropriately minimized (0.22 m<sup>2</sup>) and the volume of priming is 31 ml. The SGI has improved the oxygenator biocompatibility by a phosphorylcholine coating of the fibers. This coating is stable and it preserves platelets by decreasing the adhesion of these to the fibers.

The experimental set-up (Figure 5.1) reproduces the typical conditions of

oxygenator used during extracorporeal circulation (CEC):



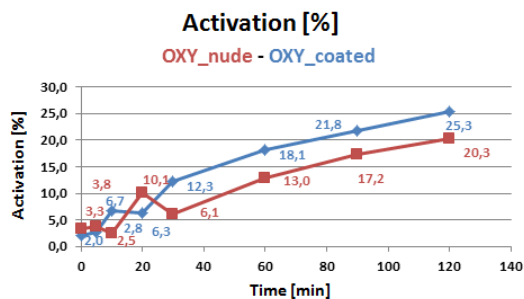
**Figure 5.1:** Schematic representation of the circuit (A); Experimental set-up (B) used for the analysis of thrombogenic risk associated with the Kids D100 neonatal oxygenator: 1. Roller pump; 2. Oxygenator; 3. Reservoir; 4. Flowmeter; 5. Pressure sensors.

In these experiments sheep’s blood has been used. The blood was collected from the jugular vein by a withdrawal using a blood’s bag (Terumo Blood Bags - CPDA - 1). Obtained EXP, we proceeded to fill and to eliminate bubbles of the circuit; initiated the Roller pump, platelet samples were taken at specified time (t) (t = 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 minutes): these stimulated platelet samples were subjected to spectrophotometric analysis,

in order to evaluate the dynamic of platelets activation with increasing residence time in the circuit.

At the end of spectrophotometric analysis the degree of activation of each sample (control samples – not stimulated -, sonicated samples and samples taken from the circuit) is evaluated in function of Abs\_slope value.

Activation value of each sample was obtained and activation% value is calculated by normalizing data respect to sonicated samples activation value. The results obtained are shown in Figure 5.2:



**Figure 5.2:** activation% of platelets samples measured during the experiment.

From Figure 5.2 we can see that:

- i) in both experiments, the PAS assay was able to discriminate an increase of platelets activation with increasing recirculating time of the platelets within the circuit;

- ii) the platelets activation results obtained in the two experiments show that the level of platelets activation associated with the "nude" fibers oxygenator and with fibers coated by phosphorylcholine are comparable.

We can therefore conclude that:

- i) these experiments verify the correctness of experimental protocols defined in this work and the accuracy of the PAS experimental procedures;
- ii) although it is not possible to take conclusions, since the low experiments number, the comparable levels of platelet activation leads to think that activation may not only be due to contact with the fibers but that is a combination effects between contact and mechanical activation, the latter generated by the stress imposed on the platelets in the hydraulic circuit. Therefore, according to these preliminary results, it is necessary to predict the changes in the test protocol in order to reduce the stress of

platelets and consequently the contribution due to the mechanical activation

## **6. Conclusions and future developments**

The objective of this thesis was the optimization of an experimental protocol for the evaluation of thrombogenic risk associated with biomedical devices for the treatment of blood. The protocol is based on the analysis of in vitro platelets activation by the PAS assay, a chemical test able to quantify the level of thrombin produced by activated platelets. Great attention has been taken to each of work phases done during this thesis project: : I) we study the biological mechanisms underlying the phenomenon of platelets activation, ii) we analyze original protocols given by the researchers of the University of Stony Brook, iii) we prepare chemical reagents needed for the execution of the test, iv) we install and test the instruments, and v) we optimize experimental protocols.

In carrying out the present work we have encountered some problems, but we

managed to solve them and to define a protocol in which, at each stage, each parameter was defined on the basis of a careful analysis of its effect. The PAS assay thus defined represents a powerful tool that can not only highlight differences in the level of activation of sonicated platelets, but it is also, and above all, able to contribute to the study and analysis of the thrombogenicity associated with blood handling devices, as demonstrated by tests carried out with the two different models of neonatal oxygenators. The main future development of these activities carried out as a direct consequence of the results obtained during the last phase of the work - the analysis of thrombogenicity induced by the two types of fiber (bare and coated with phosphorylcholine) contained in the two different tested oxygenators -. The obtained results show no statistically significant differences in the activation degree of platelets subjected to repeated passage through the two different models of oxygenator. The hypothesis is that platelets activation is caused by a combination of the effects produced by contact and mechanical activation. To be able to discriminate the two effects, more tests will be necessary, replicating the

experimental conditions of these experiments, but varying some process parameters (such as the flow rate imposed by the pump) to reduce the mechanical stress induced in the hydraulic circuit used for the test.

PAS assay is the chemical assay used in the method defined DTE, which involves the use HSD for replication in vitro of the stresses induced by a device.

## **BIBLIOGRAFIA**

- [1] Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P, Rayner M (2012), *European Cardiovascular Disease Statistics 2012*. European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis.
- [2] Kidane AG, Burriesci G, Cornejo P, Dooley A, Sarkar S, Bonhoeffer P, Edirisinghe M and Seifalian AM (2009), *Current Developments and Future Prospects for Heart Valve Replacement Therapy*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 88 (1): 290-303.
- [3] Massel D, Little SH (2001), *Risks and Benefits of Adding Anti-platelet Therapy to Warfarin among Patients with Prosthetic Heart Valves: a Meta-analysis*. J Am Coll Cardiol 37 (2): 569-578.
- [4] Jesty J and Bluestein D (1999), *Acetylated Prothrombin as a Substrate in the Measurement of the Procoagulant Activity of Platelets: Elimination of the Feedback Activation of Platelets by Thrombin*. Analytical Biochemistry 272: 64-70.
- [5] Bluestein D, Einav S, Slepian MJ (2013), *Device Thrombogenicity Emulation: A Novel Methodology for Optimizing the Thromboresistance of Cardiovascular Devices*. Journal of biomechanics 46: 338-344.
- [6] Pelosi A, *Design Optimization and Thrombogenicity Evaluation of Blood Recirculating Devices for Cardiopulmonary Bypass*. Tesi di dottorato, Politecnico di Milano, Dipartimento di Bioingegneria, 2013.



# Capitolo 1

## Introduzione

L'obiettivo generale del presente lavoro di tesi è l'ottimizzazione di un protocollo sperimentale per la valutazione del rischio trombotico associato ad alcune classi di dispositivi biomedicali per il trattamento del sangue. Nel dettaglio, il protocollo consente di valutare il livello di attivazione piastrinica tramite un saggio chimico, denominato *Platelet Activation State (PAS) assay*, in grado di quantificare il livello di trombina prodotta dalle piastrine a seguito della loro attivazione. L'attivazione piastrinica è un fenomeno che può essere causato da condizioni emodinamiche non fisiologiche che si generano all'interno dei dispositivi (attivazione meccanica) o dal contatto con i materiali artificiali di cui sono costituiti i dispositivi stessi (attivazione per contatto).

Le attività sperimentali sono state svolte presso il ThromboLab (ThLab) del Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale ( $\mu$ BSLab) del Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria (DEIB) del Politecnico di Milano e si collocano all'interno di un progetto di ricerca più ampio ad oggi tuttora in corso di sviluppo da parte dei ricercatori del  $\mu$ BSLab. Il progetto si avvale della collaborazione di due partners accademici, il gruppo di ricerca dell'Università di Stony Brook di New York e quello dell'Università dell'Arizona, situata a Tucson, e di un partner industriale, la Sorin Group Italia (SGI) di Mirandola, leader mondiale nella progettazione di dispositivi per applicazioni di cardiocirurgia, ed in particolare di dispositivi per la circolazione extracorporea (CEC).

Come punto di partenza per il presente lavoro ci si è basati sui protocolli definiti dai ricercatori dell'Università di Stony Brook, dove il *PAS assay* è stato ideato e messo a punto. Il nostro lavoro è consistito quindi, a seguito di una prima fase che ha riguardato lo studio dei fenomeni, a livello biologico, che regolano e determinano l'attivazione piastrinica, nell'analisi di tali protocolli e nella preparazione di tutti gli agenti chimici

necessari all'esecuzione degli esperimenti. Successivamente sono state replicate le varie fasi che compongono gli esperimenti e si è proceduto alla loro ottimizzazione rispetto alla strumentazione presente nel ThLab. Il PAS *assay* richiede, infatti, l'utilizzo di diversi strumenti, quali ad esempio centrifuga, colonna per filtrazione su gel, contatore di particelle, sonicatore a sonda, spettrofotometro, ecc... Tutta la strumentazione è stata installata in laboratorio, testata e collaudata nell'ambito del presente lavoro. Al termine di tali attività, in collaborazione con i ricercatori del  $\mu$ BSLab, si è quindi giunti all'effettiva messa in opera del ThLab, laboratorio che consente di effettuare test di attivazione piastrinica su dispositivi biomedicali.

Nelle fasi conclusive del lavoro sono stati effettuati alcuni test sperimentali volti alla valutazione del rischio trombotico associato all'utilizzo di ossigenatori a fibre cave (Kids D100, ossigenatori neonatali prodotti dalla SGI), dispositivi utilizzati durante interventi di cardiocirurgia in regime di CEC. Tale fase, di tipo più applicativo, ha avuto come obiettivo principale quello di validare le fasi precedenti del lavoro, ovvero di verificare la preparazione degli agenti chimici ed il corretto utilizzo dei vari strumenti utilizzati per il PAS. Inoltre, nel corso della campagna sperimentale, è stato confrontato il livello di attivazione piastrinica - per contatto - indotto dall'utilizzo di i) ossigenatori costituiti da fibre polimeriche "nude" - ossia prive di trattamento superficiale anti-trombotico - e ii) ossigenatori dotati di fibre polimeriche rivestite con fosforilcolina, al fine di verificare l'effettivo potenziale di questa molecola nel ridurre i fenomeni di adesione piastrinica e il conseguente rischio di formazione di trombi.

La tesi presentata si divide in sei diverse sezioni, ognuna delle quali presenta aspetti specifici del lavoro svolto:

- Nel presente capitolo è inquadrato l'ambito all'interno del quale si inserisce il presente lavoro. Sono descritti i fenomeni di emolisi e di trombogenesi, le maggiori problematiche riscontrate nell'utilizzo di dispositivi medici a contatto con il tessuto ematico e sono descritti i meccanismi biologici alla base dei due processi, soffermandosi principalmente sugli aspetti legati alla trombogenesi.
- Nella seconda sezione sono descritti i principali lavori presenti in letteratura volti alla valutazione dell'attivazione piastrinica. Le tecniche ad oggi più utilizzate

prevedono la combinazione di metodiche sperimentali (*in vitro*) con approcci di tipo computazionale (*in silico*).

- Nel terzo capitolo è descritto nel dettaglio il PAS *assay*. Inoltre, tale capitolo contiene la descrizione delle diverse prove sperimentali effettuate al fine di ottimizzare il PAS *assay* e giungere alla definizione di un protocollo per la realizzazione dei test di attivazione piastrinica all'interno del ThLab.
- Nel quarto capitolo sono riportati e discussi i risultati ottenuti nella fase di ottimizzazione del protocollo sperimentale per la realizzazione del PAS *assay*.
- Nel quinto capitolo è presentata l'applicazione del PAS *assay* volta allo studio della trombogenicità dei due differenti modelli di ossigenatori neonatali, ossia con fibre "nude" e rivestite.
- Nell'ultimo capitolo si espongono, infine, le conclusioni a cui si è giunti al termine del presente lavoro e i possibili sviluppi futuri del lavoro stesso.

## 1.1 Ambito di interesse

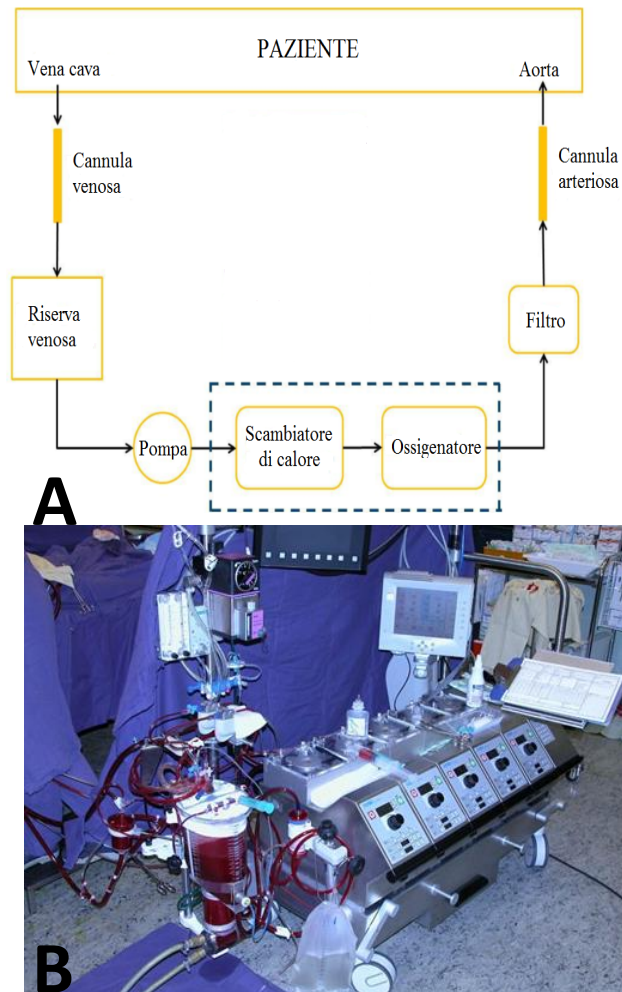
Le malattie cardiache e del sistema circolatorio (Cardiovascular Disease, CVD) rappresentano la principale causa di morte in Europa e causano ogni anno oltre 4 milioni di decessi [1]. Le principali patologie dell'apparato cardiovascolare sono lo scompenso cardiaco, l'insufficienza cardiaca, l'infarto miocardico e le valvulopatie. Tali patologie richiedono un trattamento chirurgico terapeutico (eventualmente associato ad un trattamento farmacologico) che può essere di tipo riparativo, come il by-pass aorto-coronarico nel caso dell'infarto o l'impianto di dispositivi di assistenza ventricolare (*Ventricular Assist Device*, VAD) nel caso dell'insufficienza cardiaca, e/o sostitutivo, quale la sostituzione della valvola patologica con protesi valvolari (*Prosthetic Heart Valves*, PHVs) nel caso delle valvulopatie. In entrambi i casi, l'obiettivo è quello di ripristinare la corretta funzionalità del cuore e del sistema cardiocircolatorio. Negli eventi più gravi, il trapianto cardiaco rimane l'unica soluzione totalmente efficace ma non facilmente perseguibile a causa del limitato numero di organi destinati al trapianto.

Attualmente il 20-30% dei pazienti in attesa di trapianto cardiaco sono supportati da ventricoli di assistenza che sostituiscono in tutto o in parte la normale funzione ventricolare. Tuttavia, l'utilizzo dei VAD come ponte al trapianto ha successo solo nel 75% dei casi. Questi dispositivi sono utilizzati anche come terapia di destinazione, nel caso in cui il paziente non sia un adeguato candidato al trapianto, ma in questi casi la percentuale di sopravvivenza a due anni dall'impianto scende al 34. Inoltre, l'impianto dei VADs comporta una serie di rischi associati soprattutto al verificarsi di emorragie, infezioni e fenomeni trombo-embolici [2]. La formazione di trombi all'interno del sistema di pompaggio, oltre a comportare un elevato rischio per la salute del paziente, può portare al malfunzionamento del dispositivo e rendere quindi necessario un re-intervento per la sostituzione dello stesso [3]. Nei VADs, i trombi sono causati principalmente dall'alterata emodinamica che si instaura nel dispositivo, in cui le elevate velocità che si generano ed i fenomeni di moto turbolento a cui è sottoposto il sangue espongono le piastrine ad elevati (ossia non fisiologici) valori di sforzo di taglio che ne causano la loro attivazione. In tali dispositivi, inoltre, la formazione di zone di ricircolo e ristagno, che determinano un rallentamento del flusso ematico, possono indurre l'attivazione delle piastrine. In generale, i fenomeni trombo-embolici si presentano nel 20% dei pazienti che ricevono un dispositivo di assistenza ventricolare [4]. Inoltre, l'attivazione piastrinica può essere generata dal contatto del sangue con i materiali artificiali che costituiscono il dispositivo [2]: in particolare, nelle prime due settimane successive all'impianto è stato dimostrato che l'emostasi è influenzata prevalentemente dall'attivazione piastrinica causata dal contatto con le superfici artificiali [5].

Anche nei casi di intervento di sostituzione valvolare, l'incidenza di fenomeni trombo-embolitici è molto elevata. Esistono due tipologie di PHVs: i) le valvole biologiche (*Biologic Heart Valves*, BHVs), ossia valvole di origine animale (es.: valvole porcine e/o bovine), o protesi costituite a partire dall'utilizzo di tessuto biologico di origine animale (es.: pericardio bovino e/o porcino, utilizzato per la fabbricazione dei lembi valvolari della protesi) e ii) le valvole meccaniche (*Mechanical Heart Valves*, MHVs), interamente costruite utilizzando materiali sintetici come polimeri e metalli. Il vantaggio principale nell'utilizzo delle BHVs è il loro ridotto potenziale trombogenico legato a una non significativa alterazione dell'emodinamica: esse, perciò, non richiedono una terapia anticoagulante a vita, a differenza delle MHVs. Presentano tuttavia il grande svantaggio di

avere una durata limitata nel tempo (10-15 anni) e sono quindi impiantate in pazienti anziani o in soggetti che non possono essere sottoposti ad una terapia anticoagulante. D'altro canto, i trattamenti chimici (fissaggio in glutaraldeide) che vengono effettuati al fine di consentire il trapianto della valvola animale su paziente umano, aumentano il potenziale trombogenico della protesi, dovuto all'attivazione piastrinica per contatto. A differenza, le MHVs presentano il vantaggio di avere una durata maggiore nel tempo. Tuttavia, questa tipologia di protesi valvolari richiede l'assunzione giornaliera di farmaci anticoagulanti da parte del portatore a causa dell'elevato rischio di formazione di trombi e di fenomeni trombo-embolici dovuti all'attivazione piastrinica per contatto e all'attivazione meccanica, causata, come nel caso dei VADs, dall'alterata emodinamica locale [6, 7]. I fenomeni trombo-embolici legati all'occlusione di vasi periferici, polmonari o sistemici a causa del distacco di un frammento di trombo, costituiscono il 75% delle complicazioni che si verificano a seguito di intervento di sostituzione valvolare [8]. Un'ulteriore complicazione associata all'impianto di MHVs è l'emolisi intravascolare che ha un'elevata incidenza, sino a presentarsi nell'85% dei pazienti portatori di protesi [6].

L'impianto delle protesi e dei dispositivi di assistenza sopracitati, così come gli interventi di trapianto di cuore e/o il by-pass aorto-coronarico, richiedono un tipo di intervento detto "a cuore aperto", durante il quale la funzione cardiopolmonare del paziente è momentaneamente interrotta e sostituita, in regime di CEC, attraverso l'utilizzo di un complesso di macchine artificiali, noto come macchina cuore-polmone. La CEC prevede l'esecuzione del by-pass cardiopolmonare (Figura 1.1): il sangue venoso del paziente è prelevato mediante una cannula inserita nella vena cava e, attraverso una pompa artificiale, spinto all'interno di un ossigenatore in grado di supplire la funzione dei polmoni, ossia consentire lo scambio di ossigeno ed anidride carbonica. Spesso quest'ultimo componente è dotato di uno scambiatore di calore integrato che permette di regolare la temperatura del sangue prima di essere re-immesso nel circolo sistemico del paziente attraverso un'ulteriore cannula inserita nell'aorta.



**Figura 1.1:** Rappresentazione schematica dei componenti che compongono il circuito di CEC: cannula venosa, riserva venosa, pompa, scambiatore di calore, ossigenatore, filtro, cannula arteriosa (A); Circuito CEC (B).

Le complicazioni associate a questa tecnica sono molteplici: il regime di flusso e gli elevati sforzi di taglio possono causare la rottura dei globuli rossi (emolisi) ed il contatto delle piastrine con superfici estranee può determinare attivazione e aggregazione piastrinica con conseguente formazione di trombi. La complicazione principale è associata infatti alla trombogenicità dei componenti che costituiscono il circuito extracorporeo. Infatti, i fenomeni trombotici dovuti all'attivazione piastrinica si verificano a livelli di sforzi di taglio dieci volte inferiori rispetto alle sollecitazioni che determinano l'emolisi [9]. Al fine di limitare l'insorgenza delle complicazioni associate alla CEC, durante l'intervento si

ricorre alla somministrazione di farmaci anticoagulanti e l'intero circuito viene rivestito di eparina e/o altre sostanze che diminuiscono il rischio trombotico [10].

Uno dei principali componenti della CEC è l'ossigenatore. La sua funzione è garantire una corretta ossigenazione del sangue venoso, che è successivamente reinserito nel circolo sistemico del paziente così da consentire il corretto nutrimento dei tessuti periferici durante la momentanea interruzione della funzione polmonare. L'uso degli ossigenatori non si limita alla CEC: essi sono utilizzati anche durante trattamenti terapeutici di ossigenazione extracorporea (ExtraCorporeal Membrane Oxygenation, ECMO) come supporto o sostituzione della normale funzione polmonare compromessa da patologie quali insufficienza cardiaca e/o polmonare, che non consentono la respirazione autonoma del paziente.

Attualmente, uno dei principali obiettivi perseguiti nella progettazione dei moderni ossigenatori è quello di limitare l'insorgere di fenomeni emolitici e la formazione di trombi, riducendo l'area delle superfici artificiali a contatto con il tessuto ematico e progettando il dispositivo in modo da non causare elevati stress meccanici alle cellule del sangue [11].

Il progetto di tesi da noi svolto si inserisce all'interno di tale campo di ricerca: tramite il PAS *assay* è possibile infatti eseguire test di valutazione del rischio trombotico associato ai dispositivi medici di cui si è discusso all'interno del presente capitolo. Come sarà descritto nel dettaglio nel prossimo capitolo, il PAS *assay* è uno strumento ad oggi ampiamente utilizzato in fase di progettazione e validazione dei dispositivi per la cardiocirurgia.

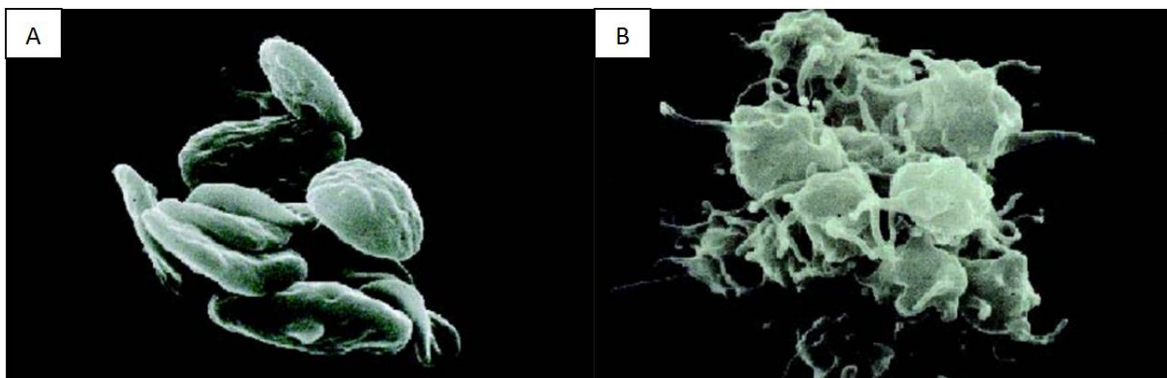
## **1.2 Problematiche associate ai dispositivi medici a contatto con il sangue: emolisi e tromboticità**

Nonostante i benefici apportati allo stato di salute dei pazienti affetti da malattie cardiovascolari, i dispositivi medici utilizzati in applicazioni di cardiocirurgia, ad oggi, non sono in grado di evitare l'insorgenza di problematiche quali l'emolisi, la rottura delle piastrine e la tromboticità [6, 7, 11]. Per limitare il verificarsi di questi eventi i pazienti

sono sottoposti a terapie anticoagulanti che spesso, però, non garantiscono la totale assenza di tali fenomeni e che, inoltre, rendono i pazienti molto vulnerabili a fenomeni emorragici [11].

L'emolisi è la rottura della membrana dei globuli rossi e determina il rilascio dell'emoglobina in essi contenuta all'interno del compartimento vascolare. La funzione dell'emoglobina è quella di legare l'ossigeno e trasportarlo verso i tessuti periferici in modo da garantire le normali funzioni metaboliche. La rottura dei globuli rossi determina perciò una minore capacità di trasporto dell'ossigeno e un conseguente aggravamento dello stato patologico del paziente [12]. Come detto in precedenza, fenomeni emolitici possono essere generati dalle condizioni emodinamiche non fisiologiche (elevati stress meccanici) alle quali è sottoposto il sangue all'interno dei dispositivi di ausilio cardiovascolare.

La trombogenicità è, invece, la propensione di un dispositivo ad indurre la coagulazione del sangue e l'attivazione piastrinica risulta la principale causa delle complicazioni tromboemboliche [13]. Le piastrine sono le più piccole cellule circolanti all'interno del sangue, il loro diametro varia in media tra i 2 e i 5  $\mu\text{m}$ , il volume tra i 6 e i 10 femtolitri ed hanno una vita media di 7-10 giorni [14]. Le piastrine sono frammenti citoplasmatici anucleati originati dai megacariociti presenti nel midollo osseo secondo un processo definito endomitosi. La loro forma discoidale (Figura 1.2 A) si modifica in risposta al processo di attivazione piastrinica: tale processo induce cambiamenti conformazionali dei numerosi filamenti di actina e del complesso sistema di microtubuli all'interno del loro citoscheletro così che le piastrine assumono una forma tondeggiante (Figura 1.2 B).



**Figura 1.2:** Piastrine non attivate (A) e piastrine attivate (B). Nell'immagine è possibile osservare il cambiamento conformazionale che avviene in seguito all'attivazione piastrinica.



Il ruolo principale delle piastrine è contribuire all'emostasi primaria dell'organismo attraverso un meccanismo di difesa che limita la perdita di sangue quando la continuità della parete vascolare viene interrotta a causa di un trauma o di una patologia vascolare. Le piastrine esercitano la loro funzione biologica attraverso quattro processi biochimici e cellulari distinti: i) adesione, ii) attivazione, iii) secrezione e iv) aggregazione [15].

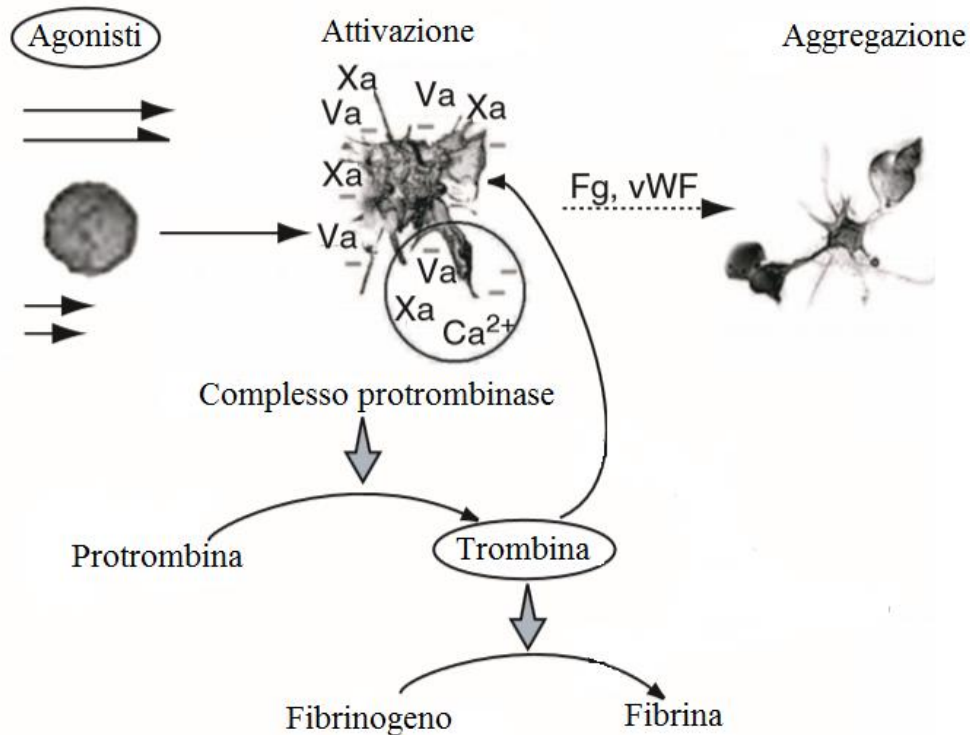
L'adesione delle piastrine al sito di danno vascolare è mediata dalla glicoproteina (GP) Ib/V/IX, un complesso insieme di recettori espressi dai megacariociti e dalle piastrine. Il legame del fattore di Von Willebrand (vWF) e del collagene rispettivamente alla subunità  $Ib_{\alpha}$  del complesso GPIb/V/IX e alla glicoproteina GPVI rappresenta la fase iniziale del processo di formazione del trombo [16].

L'attivazione delle piastrine segue il processo di adesione ed è indotta da una serie di stimoli chimici e meccanici, detti agonisti. Il legame del collagene con GPVI dà inizio ad una serie di processi intra-citoplasmatici che includono l'aumento della concentrazione intracellulare di  $Ca^{2+}$ , elemento fondamentale alla base dell'attivazione, dell'attrazione piastrinica e della loro successiva aggregazione [15, 17]. Quando le piastrine sono attivate, i fosfolipidi anionici, normalmente presenti all'interno dello strato interno della membrana plasmatica, si muovono rivolgendosi verso la superficie esterna [18]. Durante questa fase la forma discoidale delle piastrine si modifica e ha inizio l'estensione dei filopodia, come mostrato in Figura 1.3 [19].



**Figura 1.3:** Piastrine attivate: è possibile osservare l'estensione dei filipodia (1, 2, 3)

A seguito dell'attivazione, le piastrine rilasciano specifici mediatori chimici presenti all'interno dei loro  $\alpha$ -granuli, strutture presenti all'interno dell'ambiente intracellulare piastrinico, come adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina e tromboxano ( $\text{TXA}_2$ ) [15]. In presenza di  $\text{Ca}^{2+}$  i fattori piastrinici V (FVa) e X (FXa) attivati formano il complesso protrombinase sulla membrana piastrinica caricata negativamente, permettendo così la conversione della protrombina (FII) in trombina (FIIa). La trombina a sua volta catalizza la conversione del fibrinogeno in fibrina, consentendo la creazione di legami tra le piastrine adiacenti e l'endotelio sottostante, e permettendo in questo modo la formazione e la crescita del trombo [19]. Il processo appena descritto che porta alla formazione del trombo è schematizzato in Figura 1.4.



**Figura 1.4:** Schema del processo che porta dall'attivazione piastrinica alla formazione del trombo.

L'aggregazione è l'ultimo evento che porta alla formazione del trombo [15]. A seguito dell'attivazione piastrinica i cambiamenti conformazionali del complesso GPIIb/IIIa presente sulla superficie esterna delle piastrine consentono il legame con le molecole di fibrinogeno che formano ponti tra le piastrine adiacenti e portano alla formazione di aggregati [15, 20].

### 1.3 Fattori alla base dell'attivazione piastrinica

I fattori che determinano l'attivazione delle piastrine (agonisti) vengono identificati tramite la triade di Virchow: essi sono i) superficie di contatto, ii) alterazioni della composizione del sangue e iii) condizioni del flusso ematico [21].

La perdita dell'integrità della parete vascolare rappresenta il primo elemento della triade. Infatti, a causa del sanguinamento, le piastrine che entrano in contatto con una superficie artificiale si attivano (attivazione per contatto). Il rischio trombotico associato alle superfici artificiali è mediato dalle loro proprietà chimiche e fisiche. Le superfici dei

biomateriali (come i polimeri che costituiscono le membrane degli ossigenatori o i materiali metallici che compongono gli stent e le MHVs) in contatto con i fluidi e i tessuti biologici adsorbono infatti uno strato di proteine presenti nel plasma la cui natura e distribuzione dipende dall'interfaccia materiale/fluido o materiale/tessuto e determina l'adesione delle cellule ematiche. Proprietà superficiali dei materiali, quali ad esempio la carica elettrostatica e la composizione chimica, influenzano notevolmente la coagulazione del sangue. Ad esempio, superfici cariche negativamente inducono l'attivazione di fattori alla base della cascata della coagulazione, come i fattori FXII e FXI. A tal proposito, sono state sviluppate numerose tecniche di modifica superficiale finalizzate ad aumentare la biocompatibilità, ossia ridurre la trombogenicità, dei materiali utilizzati per la fabbricazione di dispositivi per il trattamento del sangue. Tra queste, la funzionalizzazione con specifici peptidi e monostrati autoassemblanti (*Self Assembled Monolayer* (SAMs) o *Layer by Layer self assembly*), e la deposizione via plasma di *film* sottili di molecole bioattive che riducono l'adesione proteica sulla superficie dei biomateriali, rappresentano alcune tecniche particolarmente efficaci volte alla riduzione - ma mai alla totale eliminazione - del rischio trombotico dei materiali.

Il secondo elemento della triade è rappresentato da alterazioni della composizione del sangue (ipercoagulazione o stato protrombotico) che trovano soluzione nell'uso di farmaci anticoagulanti.

Ultimo elemento della triade è costituito da alterazioni locali del flusso ematico, quali l'aumento/diminuzione della velocità del flusso o l'aumento della turbolenza del sangue [21]. I flussi non fisiologici che si generano all'interno dei dispositivi biomedicali risultano essere la principale causa dell'attivazione (meccanica) delle piastrine [22]. *In vivo*, infatti, il flusso fisiologico comporta livelli di sforzo di taglio variabili tra 1 e 10 dynes/cm<sup>2</sup> all'interno delle vene e tra 50 e 60 dynes/cm<sup>2</sup> nelle arterie e nelle arteriole. Sforzi di taglio che superano tali valori possono causare distacco dei filamenti fluidi del sangue e formazione di vortici che promuovono la formazione di zone di ricircolo e la conseguente attivazione piastrinica [23]. Ad esempio è stato dimostrato che nei VADs si possono raggiungere valori di sforzi di taglio prossimi a 2000 dynes/cm<sup>2</sup> [24]

Storicamente, nella ricerca e nello sviluppo dei dispositivi medicali per il trattamento del sangue è sempre stata posta maggiore attenzione alla valutazione dell'emolisi [25] e solo

negli ultimi anni la riduzione del fenomeno di attivazione delle piastrine è stato introdotto come uno dei principali criteri di progettazione [26]. Confrontando i livelli di sforzo di taglio che generano emolisi e quelli che inducono invece l'attivazione delle piastrine si può comprendere invece il perché dell'importanza di ridurre la trombogenicità dei dispositivi per il trattamento del sangue: come detto precedentemente, infatti, l'attivazione piastrinica avviene a livelli di sforzo dieci volte inferiori rispetto a quelli che generano emolisi [19].

Tale diversità trova spiegazione nella differente conformazione tra le due cellule ematiche: i globuli rossi sono dotati di una membrana flessibile che permette loro di sopportare livelli di sforzo più elevati; le piastrine presentano invece una membrana più rigida che è in grado di tollerare livelli di sforzo dieci volte inferiori [27].

In conclusione, appare evidente come le moderne tecniche terapeutiche per la cura delle CVDs richiedano l'utilizzo di dispositivi medicali che entrano in contatto con il tessuto ematico del paziente. I dispositivi in questione (PHVs, VADs, ossigenatori, ecc...) possono causare emolisi e fenomeni tromboembolici: questi ultimi sono causati principalmente dall'alterata emodinamica che si instaura all'interno del dispositivo, dove i flussi e i moti turbolenti possono determinare elevati sforzi di taglio che, agendo sulle piastrine, ne causano l'attivazione. Nonostante tutti i dispositivi utilizzati causino l'attivazione piastrinica (attivazione meccanica e/o per contatto) ed il conseguente rischio di fenomeni tromboembolici, la minimizzazione del potenziale trombogenico associato al loro utilizzo non è un criterio di progettazione utilizzato. Storicamente si è sempre data più importanza allo studio dell'emolisi causata da tali dispositivi, fenomeno che si presenta a valori di sforzi di taglio dieci volte maggiori rispetto ai valori che determinano attivazione piastrinica, e solo recentemente è stata identificata la necessità di ridurre la trombogenicità dei dispositivi per il trattamento del sangue. La riduzione della trombogenicità comporterebbe un deciso miglioramento dello stato di salute del paziente, in termini di riduzione o totale eliminazione delle terapie anticoagulanti (ad oggi necessarie), e contemporaneamente si ridurrebbero anche i fattori alla base dei fenomeni emolitici. Nel capitolo successivo saranno quindi descritti gli studi più promettenti indirizzati a tale scopo.

# Capitolo 2

## Stato dell'arte

Il settore di ricerca nel campo dello studio dell'attivazione piastrinica ha visto nel corso degli anni lo sviluppo di numerosi e differenti approcci: a partire dal 1960 sono stati effettuati studi di tipo sperimentale e/o numerico, attraverso l'utilizzo di differenti metodi e strumenti e studi più recenti si basano sulla combinazione di tali due approcci. Aggregometro di Born, viscosimetro a rotazione, saggi chimici, emoresistometro di Fleisch, citometria a flusso, tecniche basate sulla *Digital Particle Image Velocimetry* (DIPV), simulazioni numeriche di fluidodinamica computazionale (*Computational Fluid Dynamics*, CFD) costituiscono alcuni tra i vari strumenti e metodologie utilizzati per lo studio del fenomeno dell'attivazione piastrinica. Recentemente è stata inoltre sviluppata una tecnica innovativa che prende il nome di *Device Thrombogenicity Emulation* (DTE).

Nel presente capitolo sono presentati i vari approcci utilizzati, descritti gli strumenti ed il loro principio di funzionamento, e riportati i risultati di alcuni tra gli studi più significativi effettuati al fine di analizzare l'attivazione piastrinica.

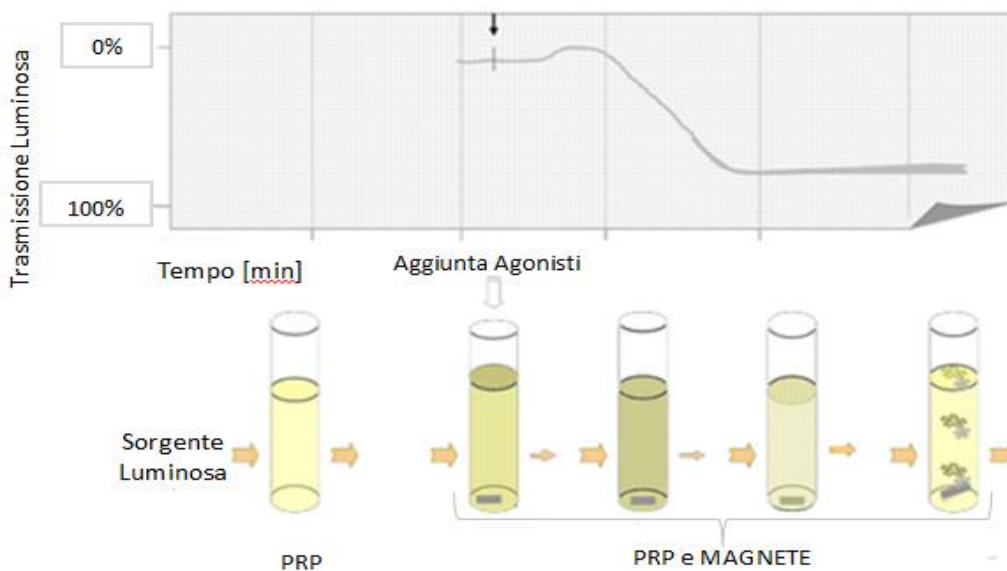
### 2.1 Approcci di tipo sperimentale

#### 2.1.1 Aggregometro di Born

Nel 1962 Born progettò un nuovo metodo per lo studio dell'aggregazione piastrinica *in vitro* in risposta all'azione di agonisti chimici, ossia molecole che agiscono sulla cascata della coagulazione inducendo l'attivazione, l'adesione o l'aggregazione delle piastrine: l'aggregometro a trasmissione luminosa. Tale tecnica prevede l'utilizzo di plasma ricco di piastrine (*Platelet Rich Plasma*, PRP) come campione su cui effettuare l'analisi. Il PRP è

ottenuto tramite centrifugazione del sangue intero addizionato con agenti anticoagulanti quali il citrato o l'eparina; la centrifugazione è funzionale a separare i vari componenti ematici consentendo così di prelevare il solo PRP che rimane infatti in superficie rispetto alle altre cellule contenute nel sangue (eritrociti e globuli bianchi) che invece si depositano sul fondo del contenitore contenente il sangue centrifugato.

Il PRP è inserito all'interno di una *cuvette* contenente un magnete che viene messo in rotazione per effetto di un campo magnetico. Il metodo prevede poi l'utilizzo di un fotometro per la misurazione della luce trasmessa attraverso il PRP che viene investito da una sorgente luminosa (Figura 2.1). A seguito dell'aggiunta di agonisti chimici quali adenosina difosfato (ADP, naturalmente presente all'interno dei granuli piastrinici, è in grado di attivare le piastrine), collagene (determina l'adesione e la conseguente aggregazione delle piastrine) e acido arachidonico (promuove l'aggregazione piastrinica), inizialmente si registra un decremento della luce trasmessa, che aumenta poi notevolmente durante la fase di aggregazione piastrinica (Figura 2.1). Attraverso tale metodica è possibile misurare ampiezza e velocità di tale aumento, correlandola così con l'entità e con la dinamica dell'aggregazione piastrinica [28].



**Figura 2.1:** Principio di funzionamento alla base dell'aggregometro di Born

Il metodo ideato da Born presenta numerosi limiti: in primo luogo, una centrifugazione non efficiente può determinare la presenza di leucociti residui nel PRP che influenzano notevolmente il fenomeno dell'aggregazione piastrinica, la quale risulta inversamente proporzionale alla concentrazione di leucociti presenti nel PRP [28]. Inoltre, l'attivazione piastrinica è indotta sia dall'azione degli agonisti chimici sia dagli sforzi tangenziali (sforzi di taglio) generati dal movimento del magnete (attivazione meccanica); pertanto non è possibile discriminare in modo selettivo quale tra questi due fattori sia effettivamente responsabile dell'attivazione. In aggiunta, i livelli di sforzo a cui sono sottoposte le piastrine durante la rotazione all'interno della *cuvette* risultano non uniformi all'interno del campione sollecitato. In particolare, l'entità della sollecitazione imposta dipende dalla distanza delle piastrine rispetto al magnete, per cui i livelli di attivazione piastrinica risultano essere non uniformi[9].

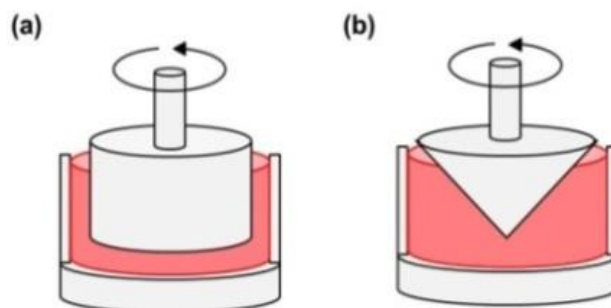
### **2.1.2 Viscosimetro a rotazione e saggi chimici**

Numerosi studi condotti negli anni successivi si sono concentrati sull'effetto che lo sforzo, ed in particolare lo sforzo di taglio ha rispetto all'attivazione piastrinica [29, 30].

Il primo strumento utilizzato per questo tipo di analisi è stato il viscosimetro a rotazione, dispositivo in grado di imporre un campo di sforzo noto ed uniforme su un campione di fluido. Tale strumento è costituito da un elemento rotante di forma cilindrica o sferica inserito all'interno di una base cilindrica in cui viene alloggiato il campione fluido oggetto del test (il PRP nel caso di studi attivazione piastrinica). Sono stati prodotti due differenti modelli di questo strumento: il viscosimetro di Couette (Figura 2.2a), costituito da un cilindro che ruota all'interno di una base stazionaria, e il viscosimetro cono-piatto (Figura 2.2b), in cui l'elemento rotante ha geometria conica. In quest'ultimo modello lo sforzo di taglio tra cono e piatto è costante, direttamente proporzionale alla velocità di rotazione del cono e inversamente proporzionale all'angolo tra il cono e il piatto. Questo tipo di viscosimetro è in grado di generare sia valori di sforzo di taglio fisiologici (2-30 dynes/cm<sup>2</sup>, valori riscontrati *in vivo* rispettivamente all'interno di vene e arterie), sia



sollecitazioni caratteristiche di condizioni patologiche ( $200 \text{ dynes/cm}^2$ , livelli raggiunti in coronarie o nelle arterie cerebrali stenotiche) [31].



**Figura 2.2:** (a) viscosimetro di Couette; (b) viscosimetro cono-piatto.

A partire dagli anni '70, lo sviluppo di specifici saggi chimici ha permesso di identificare alcuni marcatori caratteristici dell'attivazione piastrinica. I saggi chimici sono stati perciò utilizzati in combinazione con il viscosimetro per valutare l'attivazione delle piastrine in funzione di specifici marcatori espressi dalle piastrine attivate.

Nel 1975 Brown et al. [29] effettuarono i primi esperimenti utilizzando il viscosimetro cono-piatto, con lo scopo di verificare l'influenza diretta dello sforzo di taglio sul livello di attivazione piastrinica. Gli effetti prodotti dallo sforzo di taglio furono stimati analizzando la secrezione di serotonina, uno dei costituenti principali dei granuli piastrinici ed indice dell'avvenuta aggregazione, e monitorando il rilascio di fosfatasi acida, come indice dell'avvenuta rottura delle piastrine. Tramite tali studi fu possibile dimostrare come livelli di sforzo di taglio superiori a  $50 \text{ dynes/cm}^2$  inducono variazioni morfologiche delle piastrine presenti nel campione di PRP sottoposto a stimolazione, secrezione di granuli e aggregazione.

Nel 1985 Wurzinger et al. [32] condussero ulteriori esperimenti facendo uso di un viscosimetro Couette. Nei test effettuati esposero il PRP a valori di sforzo di taglio compresi tra i  $570$  e i  $2550 \text{ dynes/cm}^2$  con tempi di stimolazione variabili tra i  $7$  e  $700 \text{ ms}$ . Per determinare il livello di attivazione piastrinica valutarono la percentuale espressa del fattore piastrinico 3 (FIII, fosfolipide che riveste la superficie delle piastrine e che interagisce con il FVII promuovendo la conversione del FX in FXa). Gli autori

osservarono inoltre la dinamica di variazione della forma delle piastrine attivate e notarono che tale variazione, risultava essere maggiormente influenzata dal livello di sforzo applicato piuttosto che dal tempo di esposizione allo stimolo, infatti:

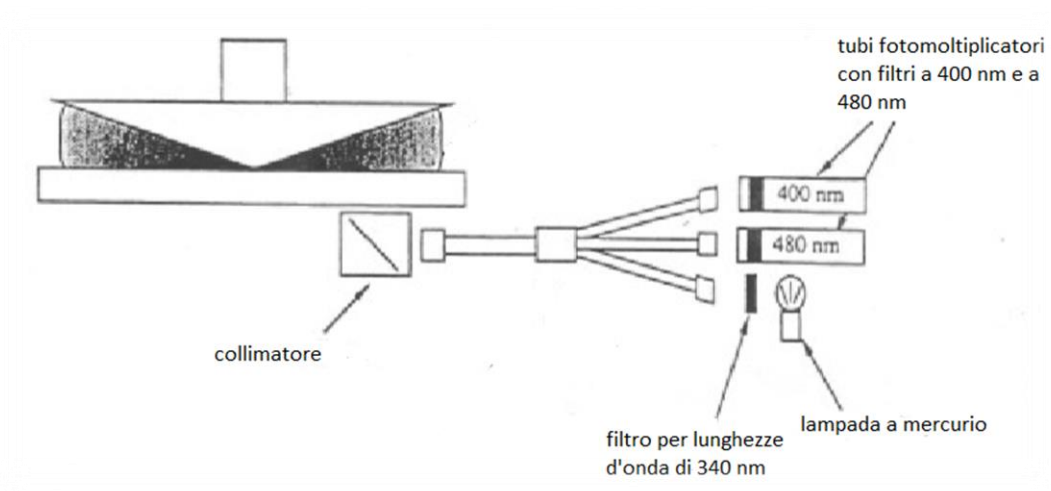
- i) livelli di sforzo di taglio maggiori di  $570 \text{ dynes/cm}^2$  applicati per 7 ms comportavano un significativo aumento della percentuale di FIII
- ii) un terzo delle piastrine esposte a valori di sforzo di taglio pari a  $570 \text{ dynes/cm}^2$  per 700 ms risultavano essere poco o del tutto non attivate
- iii) piastrine esposte a livelli di sforzo di taglio di  $1700 \text{ dynes/cm}^2$  per 113 ms risultavano essere attivate, presentando forma sferica.

In un ulteriore studio, Zhang et al. [33] sottoposero il PRP sia a valori di sforzo di taglio costanti pari a 20, 50 e  $100 \text{ dynes/cm}^2$  sia a sollecitazioni dinamiche, introducendo così un'ulteriore variabile nell'analisi della attivazione piastrinica, ovvero la forma d'onda dello stimolo applicato. Nel caso di sollecitazione dinamica, la stimolazione applicata era costituita da una fase iniziale di basso sforzo pari a  $5 \text{ dynes/cm}^2$  per 10 s, seguita da una sollecitazione intermedia a  $100 \text{ dynes/cm}^2$  applicata per un intervallo di tempo variabile tra i 2 e gli 80 s e una fase finale a  $5 \text{ dynes/cm}^2$  per 40 s. L'attivazione piastrinica è stata stimata attraverso l'analisi dell'espressione del marcatore CD62P, proteina espressa sulla membrana delle piastrine attivate. Lo studio ha evidenziato un aumento della presenza di CD62P negli esperimenti in cui le piastrine erano sottoposte a sollecitazioni dinamiche.

Nonostante l'utilizzo dei viscosimetri avesse dato un contributo notevole nello studio dei fenomeni di attivazione piastrinica, tali strumenti presentavano un grosso limite: non consentivano, infatti, di monitorare in tempo reale il comportamento delle piastrine sottoposte a sollecitazione. Il campione piastrinico era prelevato al termine della prova e solo a posteriori era valutato il livello di attivazione raggiunto dalle piastrine in esame.

Nel 1994 Hellums [34] introduce un'importante modifica al viscosimetro cono-piatto (Figura 2.3), introducendo un sistema ottico in grado di rilevare la fluorescenza dei campioni piastrinici sollecitati. In questo modo, l'aggregazione piastrinica è valutata

sfruttando lo stesso principio alla base dell'aggregometro di Born ovvero attraverso misurazioni ottiche.

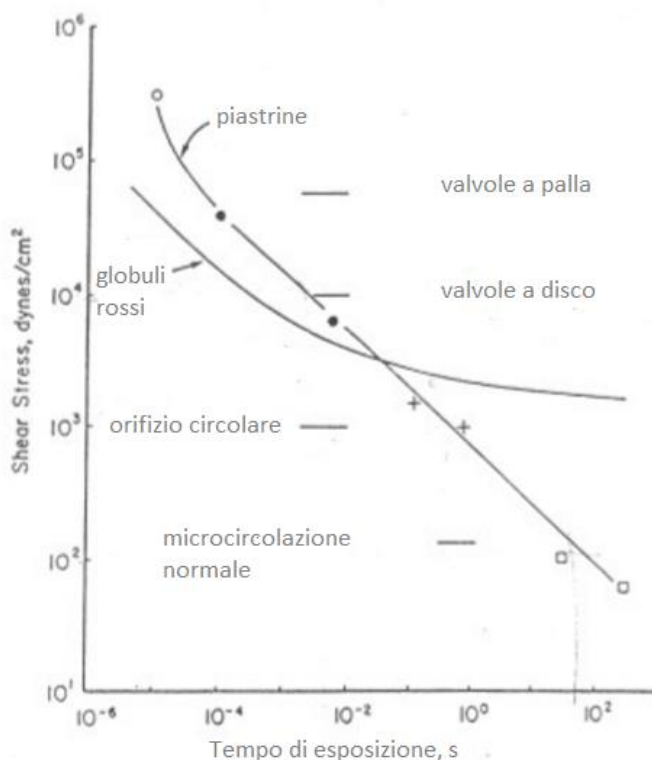


**Figura 2.3:** Modifiche apportate al viscosimetro cono-piatto da parte di Hellums: è mostrato il sistema ottico introdotto per la misura della fluorescenza del campione piastrinico

Il viscosimetro così modificato venne utilizzato per imporre valori di sforzo di taglio noti e uniformi con tempi di stimolazione variabili tra i 30 e 300 s. Negli esperimenti condotti, i ricercatori valutarono l'attività piastrinica attraverso l'utilizzo di tre differenti indici:

- i) l'aggregazione, valutata attraverso misurazioni delle variazioni della trasmissione della luce attraverso il campione piastrinico;
- ii) il rilascio di granuli, monitorato attraverso misurazioni di luminescenza, analizzando specifici enzimi in grado di legarsi all'ATP, uno dei costituenti principali dei granuli piastrinici;
- iii) l'incremento delle concentrazione intracellulare di  $\text{Ca}^{2+}$ , valutata analizzando un chelante dello ione  $\text{Ca}^{2+}$ , molecola che, una volta formato il legame con il  $\text{Ca}^{2+}$ , emette luce fluorescente la cui intensità risulta essere direttamente proporzionale alla concentrazione dello ione  $\text{Ca}^{2+}$ .

Il monitoraggio dei tre indici è stato effettuato in modo continuo durante lo svolgimento dell'esperimento. Inoltre, al termine delle prove, fu misurata la concentrazione delle piastrine al fine di valutare l'entità dell'aggregazione o l'eventuale lisi cellulare provocata dalle sollecitazioni meccaniche. Basandosi anche sugli studi precedenti, Hellums sintetizzò in un grafico (Figura 2.4) gli effetti che lo sforzo di taglio e la durata della stimolazione hanno sull'attivazione piastrinica, definendo, per un ampio range di valori di sforzi di taglio, una soglia di durata della sollecitazione al di sotto della quale le piastrine non risultano attivate. Durante i suoi studi, Hellums osservò l'esistenza di una soglia temporale di applicazione dello stimolo anche per l'emolisi dei globuli rossi (Figura 2.4). Inoltre, nel grafico sono riportati i valori di sforzo di taglio e tempo di esposizione alla sollecitazione caratteristici di alcuni modelli di protesi valvolari in uso in quegli anni (valvole a palla e a disco), a dimostrazione del loro forte potenziale emolitico e trombogenico. Tali valori sono decisamente superiori, infatti, rispetto ai valori riscontrati nella microcircolazione sanguigna o nell'attraversamento da parte del sangue di un orifizio circolare.



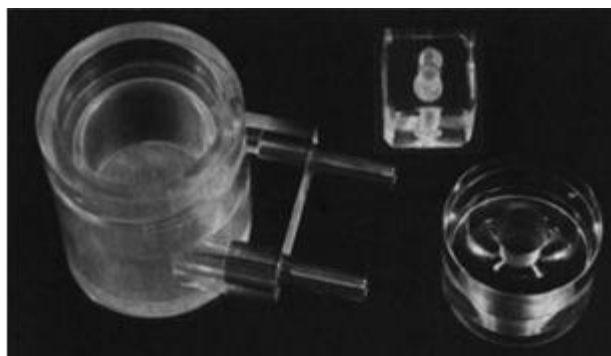
**Figura 2.4:** Soglia di attivazione piastrinica e di emolisi dei globuli rossi in funzione dell'intensità dello stimolo (sforzo di taglio) e del tempo di esposizione della sollecitazione.

Confrontando le curve di emolisi e di attivazione piastrinica si osserva come:

- i) a parità di sforzo di taglio, per tempi maggiori di esposizione alla sollecitazione, i globuli rossi risultano essere più resistenti delle piastrine
- ii) al contrario, per sollecitazioni di intensità superiore e durata inferiore, le piastrine mostrano un livello di attivazione maggiore rispetto al livello di emolisi dei globuli rossi.

### 2.1.3 Emoresistometro di Fleisch

L'emoresistometro di Fleisch è uno strumento simile al viscosimetro a rotazione. Lo strumento (Figura 2.5) è costituito da una struttura cilindrica, in cui viene alloggiato il fluido oggetto del test (il PRP nel caso di esperimenti di attivazione piastrinica), e da un cubo rotante che, immerso in tale fluido, impone su di esso le sollecitazioni desiderate. L'utilizzo di un elemento rotante di forma cubica comporta l'introduzione di un vettore accelerazione la cui componente perpendicolare risulta essere molto più rilevante di quella tangenziale: questa caratteristica determina il generarsi di urti tra il fluido e le pareti interne dello strumento, consentendo così di valutare la cosiddetta reazione da "wall impact".



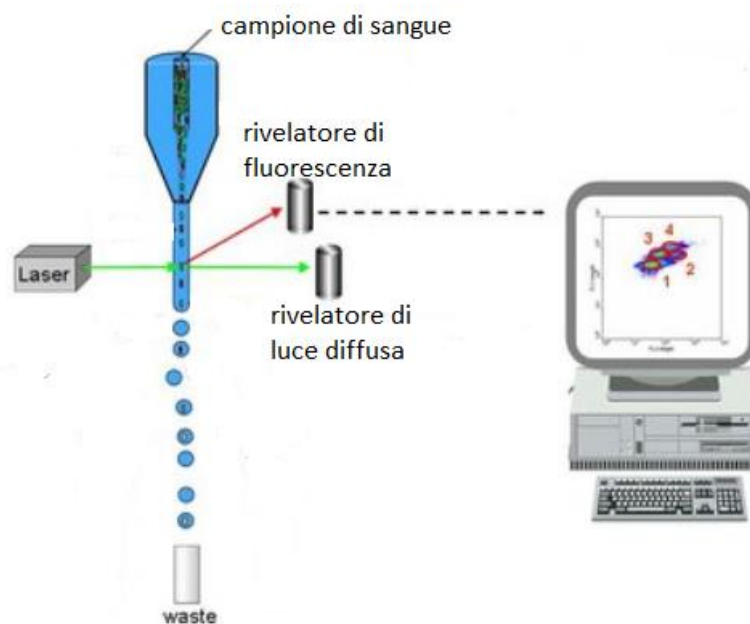
**Figura 2.5:** componenti dell'emoresistometro di Fleisch: da destra sono visibili la struttura cilindrica, il cubo rotante e il coperchio dello strumento.

Johnston et al. [35] sono stati tra i primi a valutare l'attivazione piastrinica attraverso l'utilizzo dell'emoresistometro di Fleisch. I ricercatori sottoposero il PRP a diverse prove, mantenendo costante la durata di stimolazione e variando di volta in volta l'intensità dello sforzo di taglio o, viceversa, fissata l'intensità delle sollecitazioni, variando l'intervallo di applicazione dello stimolo. In particolare, negli studi effettuati, fissata una durata di stimolazione pari a 15 min è stata imposta una velocità di rotazione del cubo pari a 600, 900, 1800 e 3600 rivoluzioni al minuto (rpm) e successivamente, fissata la velocità di rotazione a 3600 rpm, sono stati testati gli effetti di stimoli di durata pari a 1, 3, 5, 10, 15 e 60 minuti. L'analisi effettuata ha dimostrato che esiste una soglia di intensità dello stimolo (3600 rpm) al di sotto la quale le piastrine non sembrano attivarsi. Al contrario, le piastrine sollecitate al di sopra di tale soglia, anche per tempi brevi, vanno incontro a modifiche conformazionali della membrana piastrinica che porta alla loro successiva aggregazione.

I risultati ottenuti da Johnston et al. non sono però direttamente confrontabili con gli studi precedenti; infatti, l'utilizzo dell'elemento rotante di forma cubica determina una fluidodinamica, e conseguentemente un tipo di stimolazione, all'interno dello strumento, molto diversa rispetto a quella caratteristica dei viscosimetri.

#### **2.1.4 Citometria a flusso**

Più recentemente è stata sviluppata una nuova tecnica per lo studio del comportamento delle piastrine sottoposte a sollecitazioni meccaniche: la citometria a flusso. Tale tecnica si basa sulla capacità di un sistema, costituito da una luce laser e da rilevatori ottici (Figura 2.6), di riconoscere e misurare la fluorescenza emessa da un fluorocromo legato ad un anticorpo monoclonale specifico per i recettori di superficie o intra-citoplasmatici delle cellule.



**Figura 2.6:** Schema di funzionamento della citometria a flusso.

In particolare, esistono anticorpi monoclonali in grado di riconoscere e legare specifici epitopi espressi sulla membrana delle piastrine in determinate fasi della loro attività: tali epitopi permettono quindi di determinare lo stato in cui si trovano le piastrine (es.: attivate o non attivate).

Inoltre, tale metodologia consente di identificare in modo univoco le piastrine contenute all'interno del sangue e ciò permette di condurre gli esperimenti di citometria a flusso utilizzando il sangue intero, senza la necessità di dover estrarre il PRP. I vantaggi di questa tecnica sono perciò numerosi. Da primo, la minima manipolazione del campione di sangue da sottoporre al test permette di limitare la possibile attivazione piastrinica causata dai trattamenti necessari per l'estrazione del PRP (centrifugazione, prelievo del PRP, ecc..). Richiedendo l'utilizzo di piccoli volumi di sangue (circa 2  $\mu$ L), risulta essere una tecnica particolarmente adatta anche per studi in ambito neonatale [33]. Inoltre, la citometria a flusso permette l'analisi dello stato di attivazione piastrinica in presenza di tutte le cellule ematiche cosa che rappresenta un grosso vantaggio dal momento che l'aggregazione piastrinica *in vivo* è fortemente influenzata dalla presenza degli eritrociti e dei leucociti del sangue, cellule in grado di modulare il comportamento delle piastrine.

L'esperimento prevede una prima fase in cui il sangue è sottoposto ad una determinata sollecitazione all'interno di un viscosimetro cono-piatto; al termine della stimolazione, si procede al prelievo di campioni di sangue che vengono fissati con formaldeide e successivamente incubati con due anticorpi monoclonali: i) l'anticorpo 6DI, specifico per la GP1b, glicoproteina espressa sulla membrana piastrinica durante la fase di aggregazione e ii) l'anticorpo PACI, anticorpo che riconosce il complesso glicoproteico GPIIb/IIIa, espresso durante la fase di attivazione piastrinica. Prima dell'incubazione con il campione di sangue, gli anticorpi sono legati a specifici fluorocromi [36].

Attraverso questo metodo, è stato possibile valutare come:

- i) a bassi valori di sforzo di taglio ( $20-30 \text{ dynes/cm}^2$ ) l'aggregazione piastrinica risulta essere maggiore, rispetto a studi effettuati con solo PRP;
- ii) al contrario, ad alti valori di sforzo di taglio ( $140 \text{ dynes/cm}^2$ ), l'aggregazione risulta essere minore nel caso di sangue intero [9].

La citometria a flusso può essere utilizzata anche per determinare l'attivazione piastrinica *in vivo*: Abramns et al. [37] studiarono l'attivazione delle piastrine legata ad operazioni di by-pass cardiopolmonare. I prelievi dei campioni di sangue furono effettuati in corrispondenza di un'arteria subito dopo l'anestesia del paziente e in corrispondenza di una porta presente nel circuito di by-pass. L'attivazione piastrinica fu studiata attraverso l'uso dell'anticorpo monoclonale PAC1 che si lega alla GPIIb-IIIa; i ricercatori dimostrarono che già dopo 30 secondi dall'inizio dell'operazione si riscontrava un aumento del livello di attivazione delle piastrine.

La citometria a flusso presenta tuttavia anche molteplici svantaggi. In primo luogo lo strumento utilizzato è molto costoso e presenta elevati costi di manutenzione. La tecnica di preparazione dei campioni (incubazione degli anticorpi) è laboriosa e necessita di un operatore esperto. Inoltre, per evitare che le piastrine si attivino prima dell'effettivo inizio del test, il sangue deve essere processato entro 45 minuti dal prelievo. Infine, nel caso di test *in vivo* durante gli interventi chirurgici, se le piastrine attivate rimangono adese alle pareti dei circuiti extracorporei, la citometria a flusso non è in grado di valutarne l'attivazione. A tal proposito è stato infatti dimostrato che durante interventi di by-pass



cardiopulmonare il livello di attivazione piastrinica registrato attraverso la citometria a flusso risultava essere modesto se paragonato a quello rilevato attraverso altre tipologie di saggi chimici [36].

### **2.1.5 Digital Particle Image Velocimetry (DPIV)**

La *Digital Particle Image Velocimetry* (DPIV) è un metodo ottico di misura del campo di moto di particelle solide disperse in un fluido. Essa fornisce, in una determinata sezione del condotto all'interno del quale scorre il fluido, la proiezione del campo del vettore velocità di particelle traccianti con densità simile a quella del fluido. La sezione che si vuole esaminare è illuminata con due impulsi di luce laser consecutivi e ravvicinati; la luce rifratta dalle particelle è catturata da telecamere e tramite uno specifico software si ottengono due immagini differenti della posizione delle particelle nei due istanti temporali analizzati. Un confronto delle due immagini permette di ricavare il vettore spostamento che, diviso per il tempo intercorso tra i due impulsi di luce laser, consente l'identificazione del campo vettoriale di velocità delle particelle [38].

Raz et al. [39] eseguirono uno studio per verificare se la DPIV può essere utilizzata per la determinazione dell'attivazione piastrinica indotta dagli sforzi di taglio. Per validare tale ipotesi, i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti tramite simulazioni CFD e *PAS assay*. Il modello di studio utilizzato è quello di una stenosi coronarica: il circuito per lo studio tramite DPIV era costituito da i) una pompa computerizzata in grado di replicare la forma d'onda nelle arterie coronarie, ii) un fluido con proprietà reologiche (viscosità) analoghe a quelle del sangue (una soluzione formata dal 64% acqua e dal 36% glicerolo) contenente particelle riflettenti e iii) un modello di stenosi coronarica. Tramite la DPIV vennero ricavati da prima i profili di velocità e quindi lo sforzo di taglio cui erano sottoposte le piastrine all'interno del modello di stenosi coronarica. L'utilizzo di modelli predittivi dell'attivazione piastrinica ha consentito poi di correlare il valore di sforzo di taglio misurato tramite la DPIV con il potenziale trombogenico associato alla stenosi. I profili di velocità e gli sforzi di taglio ricavati tramite DPIV e CFD sono stati confrontati ottenendo una buona correlazione. Inoltre, i modelli utilizzati per la stima dello stato di

attivazione delle piastrine combinati alla tecnica di DIPV, furono validati da risultati (confrontabili) ottenuti tramite PAS *assay* condotti sullo stesso modello di coronaria stenotica.

Nonostante sia una tecnica di rilevazione molto efficace, la DPIV non consente di catturare traiettorie articolate come quelle che si generano all'interno di complessi flussi tridimensionali come quelli presenti all'interno dei dispositivi a diretto contatto con il sangue, quali valvole meccaniche, VADs e ossigenatori. Inoltre il tempo di acquisizione di due immagini consecutive è limitato dal *frame rate* della telecamere utilizzata e non può essere variato. Infine, l'aumento della velocità del flusso determina un aumento della lunghezza della traiettoria e una conseguente diminuzione dell'accuratezza associata alla misurazione [39].

### **2.1.6 Modelli empirici dell'attivazione piastrinica**

Nel corso degli anni sono stati sviluppati numerosi e differenti modelli volti all'analisi dell'attivazione piastrinica. Le prime formulazioni di questi modelli empirici si ponevano l'obiettivo di quantificare la lisi generata dalle sollecitazioni subite dalle piastrine nel passaggio attraverso alcuni dispositivi, come valvole cardiache meccaniche. Le formule utilizzate erano ricavate empiricamente (attraverso le tecniche sperimentali presentate nei precedenti paragrafi) e spesso si trattava di equazioni riadattate a partire da quelle utilizzate per la stima dell'emolisi subita dai globuli rossi.

Uno dei primi modelli ideati proponeva una descrizione matematica del comportamento delle piastrine sottoposte a sforzi di taglio. Ramstack et al. [40] proposero un modello, sviluppato a partire dai risultati ottenuti dai test sperimentali, per descrivere il fenomeno di attivazione delle piastrine rispetto alla secrezione del FIII. L'attivazione piastrinica era determinata da sforzi di taglio generati da un flusso laminare all'interno di una sezione circolare. L'apparato sperimentale era costituito da: i) una fornitura di gas compresso, ii) un pistone cilindrico, iii) una siringa e iv) una sezione di test tubulare. Il PRP, contenuto all'interno della siringa, è spinto all'interno del tubo grazie al pistone che, mosso dal gas

compresso, comprime lo stantuffo della siringa. Studiando il rilascio nel tempo di FIII da parte delle piastrine, i ricercatori ottennero curve che potevano essere fittate da funzioni esponenziali. Il livello di stimolazione  $s$  risultava dipendere sia dal livello della stimolazione che dal tempo di esposizione secondo la seguente formula (eq. 2.1):

$$s = 1 - e^{-K\gamma t} \quad (2.1)$$

Dove  $s$  rappresenta il livello di stimolazione delle piastrine determinato dalla quantità di FIII secreto dalle piastrine stesse,  $K$  è un parametro che descrive la particolare geometria utilizzata durante l'esperimento,  $\gamma$  è il valore di sforzo di taglio cui è sottoposto il campione piastrinico,  $t$  è il tempo di esposizione alla sollecitazione. Tale approccio consente la quantificazione dell'attivazione piastrinica quando gli sforzi di taglio applicati al campione rimangono costanti nel tempo: i test non permettono quindi di valutare gli effetti causati da fasi di accelerazione o decelerazione del campione.

Altri ricercatori hanno cercato di sviluppare modelli più complessi che tenessero conto di un numero più esteso di variabili e che pertanto potessero fornire dei risultati più attendibili, ovvero più simili alla realtà. Ad esempio, Boreda et al. [41] hanno definito la funzione di stimolazione delle piastrine (PSF): tale funzione analizza il livello di stimolazione delle piastrine ottenuto attraverso la combinazione di due fattori: lo sforzo di taglio ( $\tau$ ) applicato al campione piastrinico ed il tempo di esposizione ( $t$ ) alla sollecitazione (eq. 2.2).

$$PSF = \tau t^{0.452} \quad (2.2)$$

Tale studio fu effettuato su modelli sperimentali di coronarie stenotiche e fu determinato che la soglia di attivazione delle piastrine risulta essere pari a valori di  $PSF \geq 1000$ . Al fine di validare il modello proposto, furono effettuati esperimenti *in vivo* in coronarie che presentavano una riduzione del lume di passaggio, causata dalla stenosi, variabile tra il 75% e il 95%.

Anche i modelli proposti da Boreda et al. presentavano un grosso limite: la descrizione matematica del comportamento delle piastrine era analizzata sottoponendo le stesse a sollecitazioni costanti nel tempo, limitandone perciò l'uso nello studio dell'effetto di fasi di accelerazione e/o decelerazione del campione piastrinico in esame.

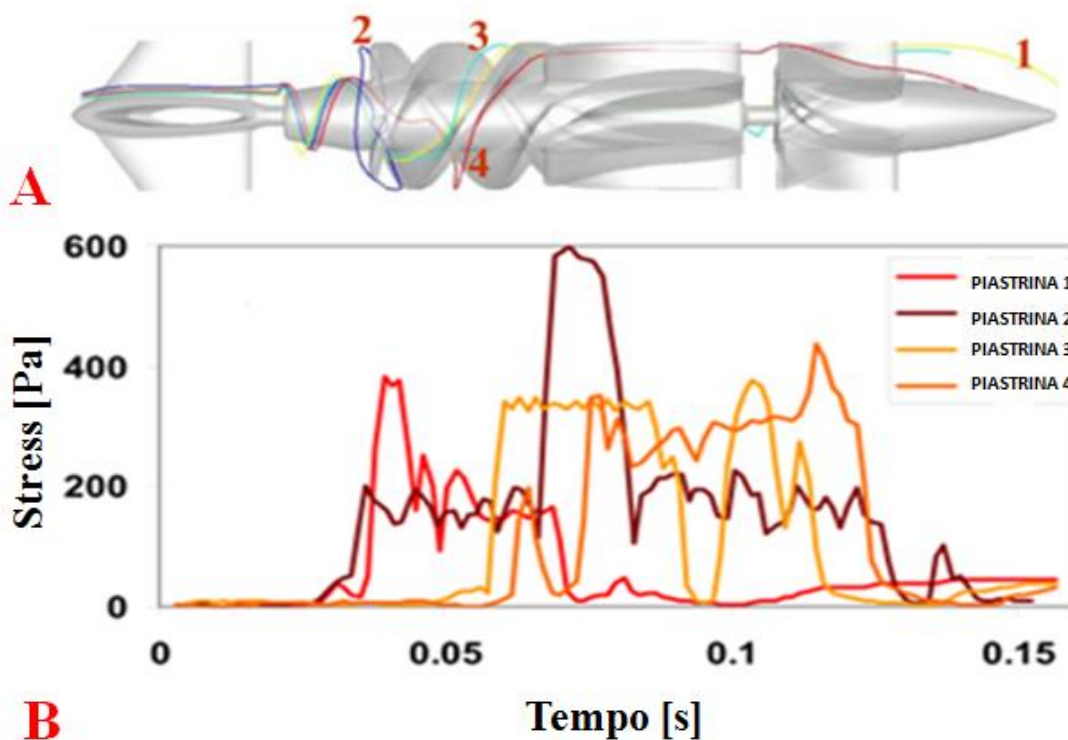
Più recentemente Grigioni et al. [42] hanno sviluppato un modello per la determinazione dello stato di attivazione delle piastrine sottoposte a valori di sforzo di taglio tempo-variabili. Questo ha rappresentato la base per lo sviluppo di un modello ideato successivamente da Nobili et al. [22]. La trattazione matematica di questo nuovo modello prende in considerazione anche la storia di carico delle piastrine. Durante il moto all'interno di un dispositivo, infatti, le piastrine sono sottoposte a sforzi di taglio variabili nel tempo e dipendenti dalla specifica traiettoria seguita da ciascuna piastrina all'interno del dispositivo di interesse: l'insieme delle sollecitazioni agenti su ciascuna particella nel tempo rappresenta la storia di carico subita dalla piastrina.

Lo sviluppo del modello di Nobili [22] consentì di analizzare l'attivazione di piastrine sottoposte a sforzi di taglio variabili nel tempo, tenendo in considerazione quindi le fasi di accelerazione e/o decelerazione del campione piastrinico all'interno del dispositivo in esame. Il modello descritto rappresentò un punto di svolta nello studio dell'attivazione piastrinica, come sarà descritto nel paragrafo successivo.

## **2.2 Approcci di tipo numerico: simulazioni di fluidodinamica computazionale**

L'avvento delle simulazioni di fluidodinamica computazionale (*Computational fluid dynamics*, CFD) ha rappresentato un chiaro e deciso punto di svolta nelle fasi di sviluppo e ottimizzazione dei dispositivi medici. Nello specifico l'analisi CFD è in grado, attraverso l'utilizzo di specifici software, di risolvere numericamente le equazioni che governano il moto dei fluidi, consentendo quindi di simulare il moto del sangue all'interno di differenti classi di dispositivi medici. In dettaglio, tale tecnica può essere utilizzata per analizzare la mappa delle velocità, delle pressioni e degli sforzi di taglio generati all'interno del dispositivo, così come delle temperature e di altre variabili fisiche. Tale tecnologia può essere impiegata nella prototipazione virtuale permettendo di ridurre i tempi e i costi di fabbricazione e collaudo del dispositivo. La capacità di valutare le performance di un dispositivo fin dai primi stadi dello sviluppo risulta essere il grande vantaggio apportato dai CFD.

Il modello CFD prevede l'utilizzo della tecnica nota come *particle tracking*; tale tecnica consente di ricavare le traiettorie seguite da un numero preimpostato di particelle (che simulano le piastrine) iniettate all'interno del dispositivo, consentendo inoltre di simulare più passaggi nel tempo. A partire da queste traiettorie (Figura 2.7), si ricava il valore dello sforzo di taglio che agisce sulle piastrine ed è possibile quindi ricavare la storia di carico subita dalle piastrine nell'attraversare il dispositivo [43].



**Figura 2.7:** Le traiettorie, simulate tramite modello CFD, seguite dalle piastrine attraverso il passaggio nel VAD (A); La storia di carico, diversa per ciascuna traiettoria, subita dalle piastrine nel passaggio attraverso il dispositivo (B).

Lo sviluppo delle tecniche CFD consentì di compiere grandi passi in avanti nello studio del rischio trombotico associato ai dispositivi a diretto contatto con il sangue, quali valvole meccaniche, VADs e ossigenatori. La tecnica CFD infatti consente di quantificare la tromboticità di un dispositivo consentendo così il confronto tra dispositivi differenti e/o tra diverse soluzioni progettuali dello stesso dispositivo, anche in assenza del prototipo fisico del dispositivo in esame. Questo consente di valutare “virtualmente” diverse

soluzioni dello stesso dispositivo e di produrre prototipi la cui trombogenicità è già stata precedentemente quantificata ed eventualmente minimizzata *in silico*.

Nonostante il grande contributo apportato allo studio dell'attivazione piastrinica, l'analisi CFD presenta però alcune limitazioni. In primo luogo, essa fornisce solo un'indicazione dell'effettivo rischio trombogenico associato al dispositivo analizzato poiché le simulazioni numeriche non sono in grado di simulare la totalità dei ripetuti, ossia i reali, passaggi all'interno del dispositivo. Inoltre, trattandosi di simulazioni numeriche, i risultati ottenuti dalle simulazioni CFD richiedono una fase di validazione attraverso l'utilizzo di tecniche sperimentali che riproducano il modello simulato [38].

### **2.3 Approcci combinati sperimentali e numerici**

Come descritto nei paragrafi precedenti, gli approcci sperimentali mirati alla valutazione dell'attivazione delle piastrine consentono di effettuare prevalentemente analisi fenomenologiche, di tipo qualitativo e/o semi-quantitativo e non in grado quindi di quantificare il rischio trombogenico associato ad un dato dispositivo medico. Tali analisi si limitavano, infatti, a stabilire l'attivazione o la non attivazione di un campione piastrinico sollecitato ma non erano in grado di determinare, ad esempio, se un tipo di sollecitazione risultasse più trombogenica di un'altra.

Per superare tale limite, recentemente è stata sviluppata una nuova tecnica che integra l'analisi sperimentale con l'approccio numerico e che prende il nome di *Device Thrombogenicity Emulation* (DTE) [44]. La DTE, come descritto in seguito nel dettaglio, permette di effettuare un'analisi di tipo quantitativo, fornendo cioè un indice che consente di confrontare i livelli di trombogenicità associati a diversi dispositivi o a differenti soluzioni progettuali dello stesso dispositivo e pertanto risulta assai utile nelle fasi di progettazione dei dispositivi a diretto contatto con il sangue (come valvole, VADs, ecc...) al fine di minimizzarne il potenziale trombogenico.

### 2.3.1 Device Thrombogenicity Emulation (DTE)

La tecnica del DTE, ideata e sviluppata presso i laboratori dell'Università di Stony Brook di New York, consente di correlare i fenomeni emodinamici all'interno dei dispositivi medici con il grado di attivazione piastrinica (attivazione meccanica) da essi provocato. La trombogenicità di un dispositivo è analizzata accoppiando l'approccio *in silico* e quello *in vitro*.

La prima fase prevede, infatti, l'implementazione di modelli numerici basati su simulazioni di CFD volte a valutare la storia di carico subita dalle piastrine nel passaggio attraverso un dispositivo; nella seconda fase, le curve di sforzo ottenute nella fase precedente sono utilizzate per stimolare *in vitro* le piastrine, utilizzando uno strumento chiamato *Hemodynamic Shearing Device* (HSD), strumento in grado di replicare le curve di carico estratte dall'analisi CFD. In funzione della risposta delle piastrine stimolate nell'HSD si procede infine alla valutazione dell'attivazione piastrinica attraverso un saggio chimico che prende il nome di *Platelet Activation State assay* (PAS assay).

Uno dei modelli attualmente utilizzati nelle simulazioni CFD che analizzano l'effetto dell'attivazione (meccanica) piastrinica è il modello sviluppato da Nobili [22]. Tale modello è stato applicato per valutare il potenziale trombogenico di protesi valvolari e dispositivi di assistenza ventricolare, in cui, come riportato nel Capitolo 1, l'emodinamica locale è fortemente alterata rispetto a quella fisiologica e lo sforzo di taglio agente sulle piastrine è molto elevato e ripetuto più volte nel tempo (ad ogni passaggio all'interno della valvola o del VAD). In particolare, il modello di Nobili et al. prevede il calcolo della funzione definita "accumulo lineare di stress" (*Stress Accumulation*, SA, eq. 2.3), definita come l'integrale rispetto al tempo dei valori di sforzo di taglio ricavati per ciascuna traiettoria seguita dalle piastrine [45].

$$SA = \int_{t_0}^t \tau dt \quad (2.3)$$

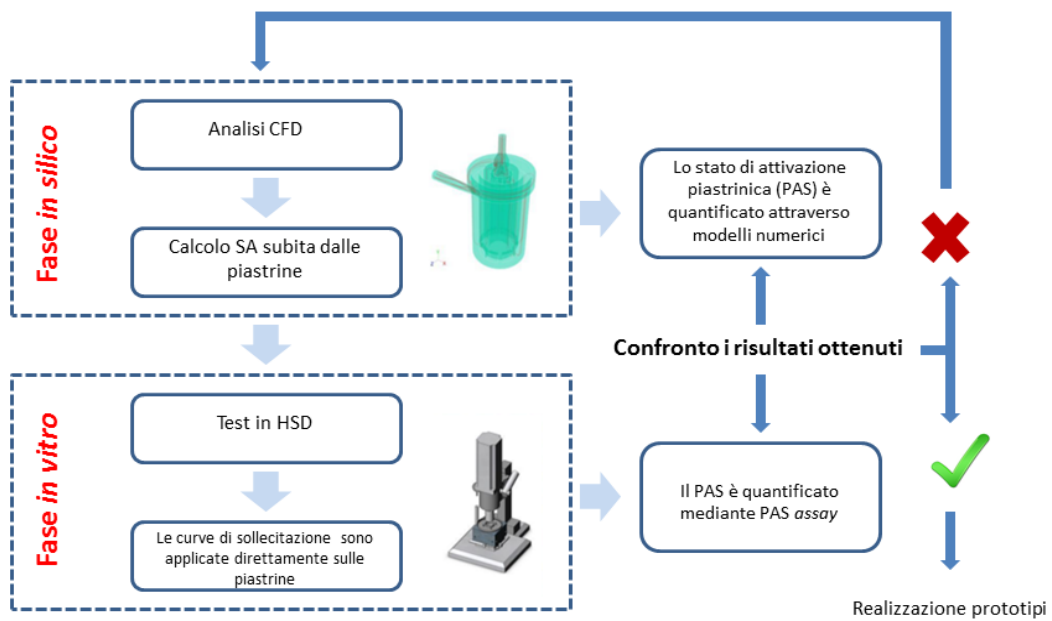
La funzione SA rappresenta così una sintetica descrizione del potenziale trombogenico del dispositivo in esame. Lo stato di attivazione piastrinica (*Platelet Activation State*, PAS) è quantificato poi attraverso un modello matematico, inizialmente proposto per stimare l'emolisi subita dai globuli rossi [46], e successivamente adattato per il calcolo del PAS [41]. Lo stato di attivazione piastrinica è così calcolato (eq. 2.4):

$$PAS = \int_{t_0}^t C a \left[ \int_{t_0}^{\varphi} \tau(\xi)^{\frac{b}{a}} d\xi + \left( \frac{PAS(t_0)}{c} \right)^{a-1} \right] \tau(\varphi)^{\frac{b}{a}} d\varphi \quad (2.4)$$

Il termine all'interno delle parentesi quadre rappresenta la sollecitazione meccanica subita dalle piastrine ottenuta sommando i singoli contributi generati in un intervallo di tempo infinitesimo. Il valore di  $PAS(t_0)$  rappresenta l'attivazione piastrinica misurata all'istante iniziale  $t_0$ , ed il valore delle costanti  $a$ ,  $b$ ,  $C$  sono ricavate da dati sperimentali. La funzione  $PAS$  può assumere valori tra 0 e 1, dove 0 indica la completa assenza di attivazione e 1 il grado di attivazione massima.

La tecnica DTE è ad oggi spesso integrata nella fase di progettazione dei dispositivi medici. Il processo è di tipo iterativo: se la trombogenicità del dispositivo è ritenuta accettabile si procede con la realizzazione dei prototipi, altrimenti, in funzione dei risultati ottenuti, si procede alla modifica del disegno e/o di particolari caratteristiche del dispositivo nel tentativo di ridurre ulteriormente il potenziale trombogenico [47]. A questo punto si può procedere ad una nuova analisi del dispositivo modificato in modo da valutarne l'effettiva efficacia in termini di riduzione del rischio trombogenico ad esso associato. In Figura 2.8 è schematizzato un esempio di tale approccio: nel caso presentato lo studio riguarda la minimizzazione del potenziale trombogenico di un prototipo di ossigenatore a fibre cave realizzato dalla Sorin Group Italia (SGI) [48].

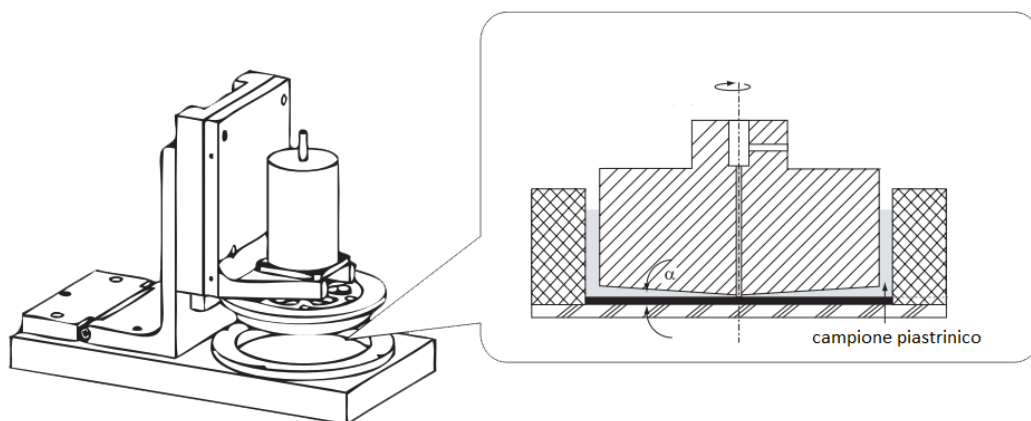




**Figura 2.8:** Schema a blocchi dell'analisi del potenziale trombotico di un prototipo di ossigenatore a fibre cave mediante tecnica DTE [48].

### 2.3.1.1 Hemodynamic Shearing Device (HSD)

Al fine di replicare *in vitro* le curve di sollecitazione ricavate dall'analisi *in silico* attraverso le simulazioni di CFD si ricorre all'utilizzo di uno strumento specifico denominato *Hemodynamic Shearing Device* (HSD), la cui rappresentazione schematica è riportata in Figura 2.9.



**Figura 2.9:** Riproduzione schematica dell'*Hemodynamic Shearing Device*

L'HSD è stato progettato in modo tale da poter sollecitare *in vitro* un campione piastrinico replicando la storia di carico subita dalle piastrine nel passaggio attraverso un dispositivo medico che entra in contatto con il flusso ematico. Lo strumento è infatti programmabile ed in grado di applicare le curve di sforzo ricavate tramite analisi CFD [49]. Il campione piastrinico utilizzato in questo tipo di esperimenti è denominato *Gel filtered Plasma* (GFP), ottenuto tramite un processo di filtrazione del PRP volto a trattenere ed eliminare le proteine plasmatiche: la procedura per l'ottenimento del GFP e la spiegazione del rationale di tale processo sono riportate in dettaglio nel Capitolo 3.

L'HSD è un'evoluzione del sistema prodotto da Blackman [50]: presenta la caratteristica del viscosimetro cono-piatto accoppiata a quella del viscosimetro di Couette ed è stato progettato in modo che la sollecitazione di sforzo di taglio nella regione di Couette risulti uguale a quella nel cono e costante in ogni punto (eq. 2.5):

$$\tau_{\text{Cono-Piatto}} = \tau_{\text{Couette}} \rightarrow \mu \frac{\omega}{\alpha} = 2\mu \frac{R_o^2 R_i^2}{R_o^2 - R_i^2} \left( \frac{1}{r^2} \right) \Big|_{r=R_i} \quad (2.5)$$

dove  $\mu$  rappresenta la viscosità del campione piastrinico,  $\alpha$  è l'angolo tra cono e piatto,  $\omega$  è la velocità angolare del cono, che assume valori diversi a seconda della forma d'onda che deve essere riprodotta dallo strumento, e  $R_o$  ed  $R_i$  sono rispettivamente il raggio del cilindro e il raggio del cono.

La base dello strumento è costituita da un blocco di alluminio all'interno del quale sono realizzati appositi canali in cui scorre acqua termostata, che mantiene il campione piastrinico alla temperatura di 37°C durante il test. All'interno della base vi sono gli elementi a contatto con il campione piastrinico (cilindro e cono), realizzati in polietilene ad ultra alto peso molecolare (*Ultra High Molecular Weight Polyethylene*, UHMWPE), materiale scelto poiché permette di minimizzare l'attivazione piastrinica da contatto [24]. Il campione di GFP (volume variabile tra i 3 ed i 3.5 ml) viene inserito all'interno dello strumento e occupa l'interstizio tra piatto e cono e la regione di *Couette*. Durante il test, l'attivazione (meccanica) piastrinica generata dallo sforzo di taglio applicato dallo strumento è misurata in tempo reale prelevando campioni di GFP ad intervalli di stimolazione predefiniti e sottoponendoli al PAS *assay*. Il GFP viene prelevato attraverso l'utilizzo di una pompa a siringa, al fine di minimizzare la sollecitazione imposta durante il

prelievo del campione e non falsare così l'esito del test, ovvero attivare le piastrine durante il prelievo dei campioni.

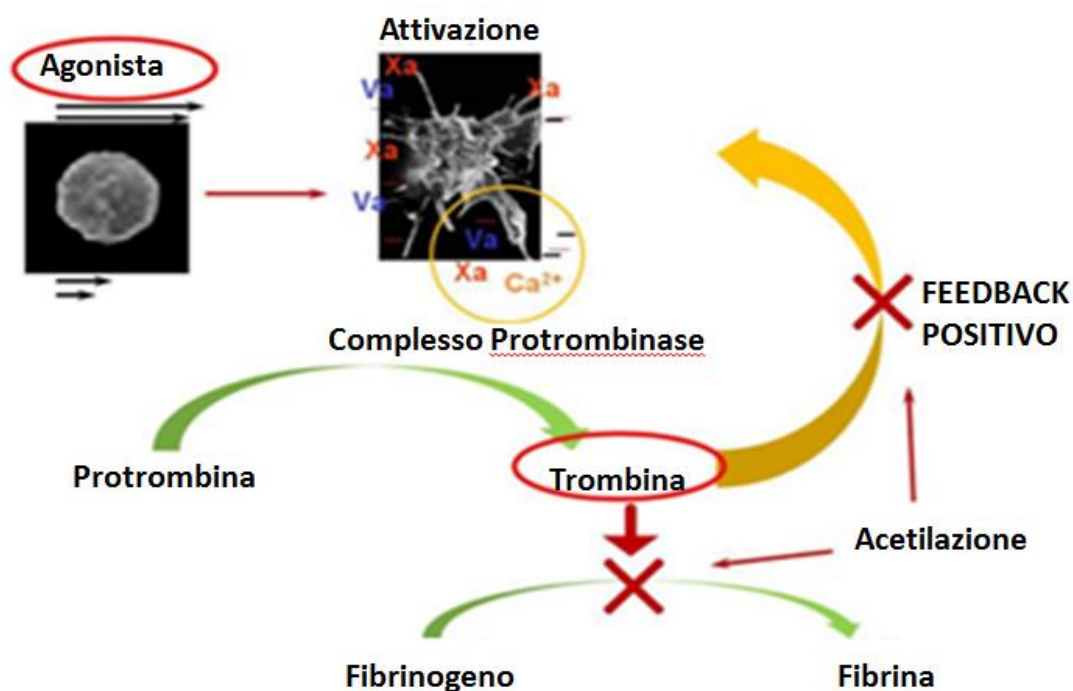
L'utilizzo dell'HSD permette di replicare le sollecitazioni dinamiche subite dalle piastrine in una vasta gamma di dispositivi medici, senza la necessità che tali dispositivi siano stati effettivamente realizzati. Infatti, le curve di sforzo di taglio sono ottenute da modelli virtuali (simulazioni CFD) del dispositivo. L'HSD risulta perciò uno strumento estremamente versatile ed utile nella fase di progettazione e ottimizzazione di tutti quei dispositivi per il trattamento del sangue in cui potenziale trombogenico è principalmente dovuto all'attivazione meccanica. Inoltre tale tecnica permette di valutare selettivamente l'attivazione piastrinica generata dai soli agonisti meccanici in quanto l'attivazione da contatto è minimizzata e, grazie al PAS *assay*, il ruolo di agonisti chimici risulta essere ridimensionato, come descritto nel dettaglio nel paragrafo successivo.

### **2.3.1.2 Platelet Activation State assay (PAS assay)**

Lo stato di attivazione piastrinica prodotto dalle sollecitazioni esercitate sulle piastrine nell'HSD è quantificato attraverso un saggio chimico che prende il nome di *Platelet Activation State* (PAS) *assay*. Tale saggio è stato sviluppato da Jesty e Bluestein [47] e consente di valutare l'attivazione delle piastrine stimolate attraverso un saggio cromogenico che misura la produzione di trombina, un importante indicatore dell'avvenuta attivazione piastrinica. Quando le piastrine risultano attivate dalla presenza di agonisti chimici o meccanici, i fosfolipidi anionici, normalmente presenti all'interno dello strato interno della membrana plasmatica, si muovono rivolgendosi verso la superficie esterna. Contemporaneamente il fattore V (FV), presente all'interno degli  $\alpha$ -granuli delle piastrine, si attiva e la sua forma attivata (FVa) è espressa sulla membrana esterna della piastrina, insieme alla forma attivata del fattore X (FXa). Il complesso formato da FXa – FVa – fosfolipide anionico prende il nome di complesso protrombinase e permette la conversione della protrombina (FII) in trombina (FIIa). La trombina a sua volta catalizza la conversione del fibrinogeno in fibrina, consentendo la creazione di legami tra le piastrine adiacenti e l'endotelio sottostante, permettendo in questo modo la formazione e la crescita del trombo [19].

La quantificazione dell'attivazione piastrinica dovuta alle sole sollecitazioni meccaniche basandosi sulla misura della trombina prodotta è complesso poiché questo enzima è a sua volta un potente attivatore e si comporta cioè da agonista chimico attraverso un meccanismo di feedback: tale meccanismo comporta cioè un ulteriore incremento del livello di attivazione delle piastrine. Per correlare quindi in maniera diretta ed univoca gli sforzi meccanici subiti dalle piastrine e il loro livello di attivazione è perciò necessario eliminare il feedback positivo della trombina. A tal proposito, Jesty e Blustein [47] hanno identificato una tipologia di protrombina che può essere attivata dal complesso protrombinase senza determinare un incremento dell'attivazione piastrinica, eliminando cioè il meccanismo di feedback positivo fisiologico proprio della trombina. Questo particolare tipo di protrombina è ottenuta attraverso un processo di acetilazione (il procedimento chimico di acetilazione della protrombina sarà descritto nel dettaglio in Appendice A). La protrombina acetilata (Ac-FII) è attivata dal complesso protrombinase al pari della protrombina fisiologica ma genera un enzima (la trombina acetilata (Ac-FIIa)) che non è in grado di convertire il fibrinogeno in fibrina.

Attraverso l'acetilazione della protrombina, la cascata della coagulazione viene perciò modificata, come mostrato in Figura 2.10:



**Figura 2.10:** La cascata della coagulazione modificata in presenza della protrombina acetilata.

Eliminato quindi il meccanismo di feedback è possibile ottenere una dipendenza lineare tra l'attivazione piastrinica e la generazione di trombina indotta da quel livello di attivazione [51]. Ciò consente in definitiva di stabilire un rapporto lineare tra lo sforzo di taglio generato all'interno dell'HSD (lo stimolo) e la quantità di trombina prodotta dalle piastrine attivate [24].

Nonostante le modifiche apportate, la Ac-FIIa è ugualmente riconosciuta dal substrato p-nitroanilide della cromazina (CH-TH), ossia il cromoforo utilizzato nel PAS *assay* per quantificare l'attivazione piastrinica. La CH-TH è tagliata dalla trombina in un residuo peptidico e nel 4-nitraniline, la cui assorbanza è misurata a 405 nm attraverso uno spettrofotometro [52]. La quantificazione dell'attivazione piastrinica è misurata attraverso una lettura in spettrofotometro del campione di GFP stimolato in HSD a cui viene addizionata la CH-TH. Al termine dell'analisi, il grado di attivazione piastrinica viene quantificato attraverso la pendenza della curva che descrive la variazione di assorbanza nel tempo del campione piastrinico in esame: maggiore sarà la pendenza della curva di assorbanza maggiore sarà l'attivazione piastrinica, ossia maggiore sarà stata la quantità di trombina prodotta che avrà reagito con la CH-TH.

### **2.3.2 Applicazione del DTE nello studio dell'attivazione piastrinica di dispositivi medici a contatto con il sangue**

Nel corso degli anni la tecnica del DTE è stata applicata da numerosi ricercatori al fine di quantificare il potenziale trombogenico di una vasta gamma di dispositivi medici a diretto contatto con il tessuto ematico.

I primi studi effettuati si sono posti l'obiettivo di confrontare diverse tipologie di protesi valvolari meccaniche (MHVs) presenti sul mercato per valutare a quale modello fosse associato il rischio trombogenico maggiore [45]. Le MHVs esaminate sono state inizialmente modellizzate e analizzate attraverso simulazioni numeriche CFD al fine di identificare le sollecitazioni subite dalle piastrine nel passaggio attraverso la geometria di ciascuna valvola, tramite la tecnica del *particle tracking* ed il calcolo della funzione SA (modello di Nobili et al., descritto nel paragrafo 2.3.1). Successivamente, le curve di sforzo

sono state replicate su campioni piastrinici di GFP attraverso l'HSD. L'attivazione piastrinica è stata infine valutata mediante PAS *assay*.

In uno studio successivo la tecnica del DTE è stata utilizzata per ottimizzare il disegno della geometria di una specifica protesi valvolare al fine di ottimizzarne le prestazioni *in vivo* e ridurre il rischio trombotico, concentrando l'analisi su quelle zone della protesi ad elevato rischio trombotico [53]. L'analisi condotta ha consentito di: i) ottimizzare gli spazi tra i foglietti e l'anello della valvola, ii) massimizzare l'angolo di apertura dei foglietti valvolari e iii) aumentare la dimensione della fessura tra i foglietti valvolari nella fase di chiusura della valvola in modo tale da ridurre lo sforzo di taglio subito dalle piastrine nella fase di rigurgito.

Studi condotti recentemente hanno valutato il rischio trombotico associato a due differenti modelli di dispositivi di assistenza ventricolare (VADs) [24]. Le sollecitazioni subite dalle piastrine sono state analizzate attraverso analisi CFD e la fase sperimentale è stata condotta utilizzando un prototipo del VAD, facendo circolare cioè il campione piastrinico all'interno del dispositivo nelle reali condizioni di funzionamento clinico. I campioni piastrinici prelevati dal VAD dopo un numero determinato di passaggi sono stati poi analizzati tramite PAS *assay*. Lo studio ha permesso l'ottimizzazione del disegno del dispositivo e le modifiche applicate hanno mostrato un decremento di un ordine di grandezza del livello di attivazione piastrinica indotta.

L'analisi combinata *in silico* e *in vitro* caratteristica del DTE è stata applicata anche nello studio della tromboticità associata a dispositivi utilizzati durante interventi di cardiocirurgia in regime di CEC quali ossigenatori e scambiatori di calore [48]. La ricerca effettuata in collaborazione tra l'Università di Stony Brook ed i ricercatori del Gruppo di Biomeccanica del Politecnico di Milano si è posta l'obiettivo di verificare il grado di aderenza di alcuni modelli predittivi dell'attivazione piastrinica con i risultati ottenuti sperimentalmente, giungendo all'ulteriore ottimizzazione di tali modelli.

In conclusione, la tecnica DTE presentata in questo ultimo paragrafo costituisce un metodo innovativo che combina l'approccio numerico con l'analisi sperimentale al fine di determinare il potenziale trombotico di una vasta gamma di dispositivi per il trattamento del sangue, quali protesi valvolari, dispositivi di ausilio alla funzione cardiaca come i VADs e dispositivi utilizzati in CEC. I vantaggi apportati dal DTE sono molteplici.

Innanzitutto, grazie alla combinazione dell'approccio numerico con quello sperimentale, consente di quantificare la trombogenicità di un dispositivo, permettendo così il confronto tra dispositivi differenti e/o tra diverse soluzioni progettuali dello stesso dispositivo. In secondo luogo, la tecnica DTE può essere utilizzata durante la fase di progettazione e/o ottimizzazione "virtuale" del dispositivo poiché non richiede la presenza del prototipo del dispositivo per valutarne la trombogenicità. L'utilizzo di questa tecnica nelle fasi di progettazione consente di produrre dispositivi il cui potenziale trombogenico è già stato "ottimizzato" e testato *in vitro* prima del suo utilizzo su paziente umano. Ciò consente di limitare la produzione di prototipi fisici e la necessità di numerosi test sperimentali, molto onerosi dal punto di vista economico, da eseguirsi ad ogni modifica introdotta nel dispositivo. Il DTE costituisce quindi un metodo di studio estremamente versatile che può essere applicato in diverse fasi della progettazione di un dispositivo.

La minimizzazione della trombogenicità di un dispositivo permette inoltre di limitare la terapia anticoagulante cui sono sottoposti i pazienti, diminuendo i rischi associati all'assunzione di questi farmaci [24].

L'analisi DTE presenta tuttavia un limite, ossia la capacità di analizzare la trombogenicità di un dispositivo dal punto di vista delle sole sollecitazioni meccaniche cui sono soggette le piastrine. L'analisi del rischio trombogenico del dispositivo è perciò carente per quanto riguarda l'attivazione piastrinica causata dal contatto con le superfici dei materiali artificiali di cui esso è costituito.

# Capitolo 3

## Protocolli sperimentali per il PAS *assay*

La valutazione del potenziale trombogenico di un dispositivo tramite la tecnica del DTE è basata sull'esecuzione di un saggio chimico, il PAS *assay*, che consente di misurare la quantità di trombina prodotta dalle piastrine e correlarla con il loro livello di attivazione. Il PAS *assay* richiede la preparazione di diversi reagenti chimici e l'utilizzo di differenti strumenti al fine di analizzare i campioni piastrinici.

Nel presente capitolo è riportata la descrizione delle campagne sperimentali effettuate, mirate all'ottimizzazione del protocollo per l'esecuzione del saggio. In particolare sono descritti:

- i) i reagenti chimici utilizzati per la preparazione e l'analisi dei campioni (i protocolli chimici di preparazione dei reagenti sono riportati in dettaglio in Appendice A);
- ii) il principio di funzionamento degli strumenti utilizzati ed i test di collaudo effettuati durante la loro installazione nel ThLab, il nuovo laboratorio allestito e dedicato alle specifiche attività sperimentali;
- iii) i test effettuati al fine di definire i protocolli sperimentali definitivi da adottare nella esecuzione degli esperimenti di attivazione piastrinica.

### 3.1 Il PAS *assay*

Il PAS *assay*, come accennato nel precedente capitolo, è un saggio chimico che si compone di diverse fasi, elencate di seguito:

1. Estrazione del PRP: prevede la centrifugazione del sangue intero per la collezione del solo plasma ricco di piastrine;



2. Estrazione del GFP: prevede la filtrazione del PRP attraverso l'uso di una colonna per filtrazione su gel in modo da eliminare tutti i componenti proteici presenti nel plasma che andrebbero ad inficiare il buon esito dell'*assay*;
3. Conta piastrinica: effettuata per misurare la concentrazione di piastrine nel GFP, al fine di aliquotare correttamente i reagenti da utilizzare nelle fasi successive, è eseguita tramite uno strumento chiamato *Coulter Particle Counter*;
4. Preparazione del campione per l'esperimento: la prima fase consiste nella diluizione del GFP con una soluzione chiamata *platelet buffer* (PB) al fine di ottenere una concentrazione nota di GFP; successivamente sono opportunamente addizionate le aliquote dei vari reagenti ( $\text{Ca}^{2+}$ , Ac-FII, FXa, CH-TH, ecc...) necessari alla quantificazione della trombina prodotta dalle piastrine attivate;
5. Sonicazione: effettuata tramite un sonicatore a sonda, consente di attivare un campione di GFP fino al massimo valore di attivazione ottenibile; in tal modo è possibile valutare (in termini di differenza percentuale rispetto al livello di attivazione del campione sonicato) il livello di attivazione piastrinica del campione oggetto del test;
6. Lettura spettrofotometrica: l'analisi in spettrofotometria costituisce l'ultima fase del protocollo del PAS *assay*. Lo spettrofotometro rileva la dinamica della variazione del valore di assorbanza del campione durante un intervallo di tempo prestabilito. La pendenza della curva (che ha andamento lineare) descrive la variazione di assorbanza nel tempo ed è un indice della quantità di trombina prodotta dal campione, ossia del livello di attivazione dal campione piastrinico in esame.

### **3.1.1 Collezione del sangue intero ed estrazione del PRP**

Il PRP è ottenuto tramite centrifugazione di sangue intero. Negli esperimenti condotti nell'ambito del presente progetto è stato utilizzato sangue di origine bovina, prelevato presso un macello locale durante la macellazione dell'animale. Il sangue è collezionato dalla giugulare recisa dell'animale e raccolto in un contenitore in polietilene (PE), materiale che minimizza il rischio di attivazione piastrinica per contatto. In cui è precedentemente inserita la soluzione di anticoagulante. Inoltre, le pareti del contenitore utilizzato per la raccolta del sangue sono bagnate con la soluzione anticoagulante per evitare la formazione di coaguli.

La soluzione di anticoagulante utilizzata per i nostri esperimenti è una soluzione di acido citrico-citrato-destrosio anidro (ACD-A), aggiunta al campione di sangue in rapporto 1:10 (vol/vol). Le sue proprietà anticoagulanti derivano dalle proprietà dell'acido citrico e del citrato, chelanti del  $\text{Ca}^{2+}$ , che sequestrano il  $\text{Ca}^{2+}$  presente nel sangue rendendolo insolubile: la mancanza di disponibilità di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  impedisce l'attivazione piastrinica poiché, in assenza di  $\text{Ca}^{2+}$ , il FVa e il FXa non possono formare il complesso protrombinase; in tal modo è interrotta la cascata della coagulazione ed in particolare la conversione del FII in FIIa. L'acido citrico consente inoltre la conservazione del sangue raccolto che dovrà poi essere trasportato in laboratorio per l'esecuzione dei test.

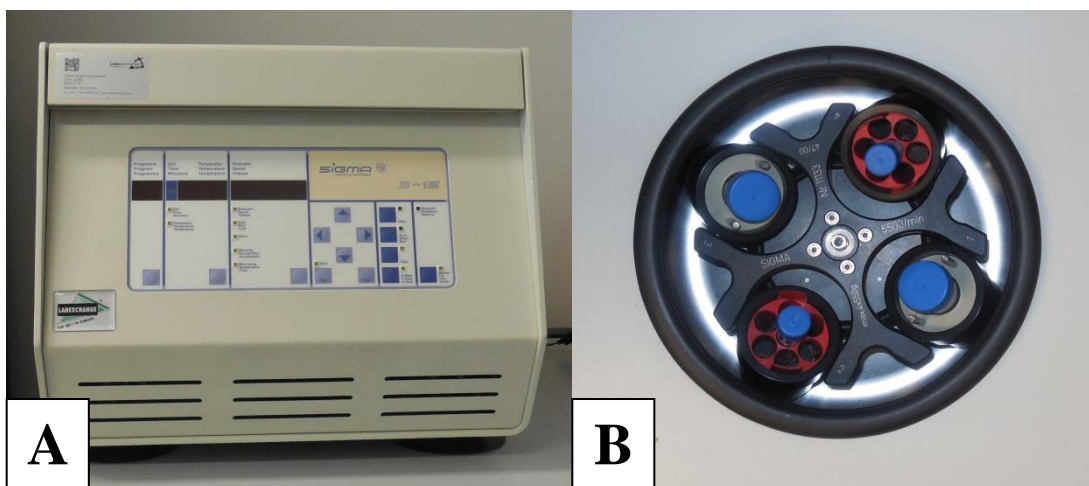
Una volta trasportato in laboratorio, il sangue è filtrato al fine di eliminare eventuali coaguli che potrebbero essersi formati durante la fase di raccolta: tale operazione è eseguita versando delicatamente il sangue in un secondo contenitore in PE tramite un imbuto all'interno del quale è posta una membrana porosa (porosità circa  $40\ \mu\text{m}$ ) in grado di trattenere gli eventuali coaguli. Successivamente, volumi di sangue di circa 30 ml sono versati dolcemente all'interno di Falcon coniche da 50 ml (Figura 3.1) e sottoposti a centrifugazione al fine di separare il PRP dalle altre cellule ematiche.



**Figura 3.1:** Falcon contenenti circa 30 ml di sangue intero che verrà sottoposto a centrifugazione.

La centrifuga da laboratorio è uno strumento atto ad accelerare la separazione tra corpi in soluzione aventi differente densità e dimensione. Particelle in soluzione, se lasciate in quiete, sedimentano con una velocità proporzionale alla forza di gravità. Tramite un moto rotatorio uniforme generato dal motore dello strumento, la centrifuga impone una accelerazione (accelerazione centrifuga) che dà origine ad un campo gravitazionale in grado di imporre una forza maggiore rispetto a quella di gravità, velocizzando così il fenomeno di sedimentazione e separazione delle particelle.

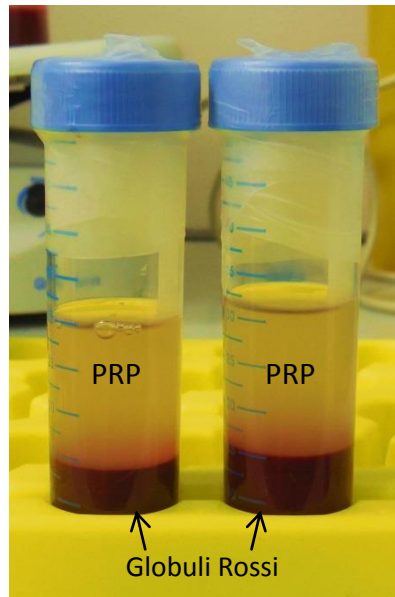
La centrifuga installata nel ThLab (SIGMA 3-15, Sigma Centrifuge, Figura 3.2 A) è dotata di un rotore a quattro bracci oscillanti (Figura 3.2 B) in cui sono alloggiati le Falcon contenenti il sangue intero che si vuole processare.



**Figura 3.2:** (A) centrifuga, (B) rotore a bracci oscillanti.

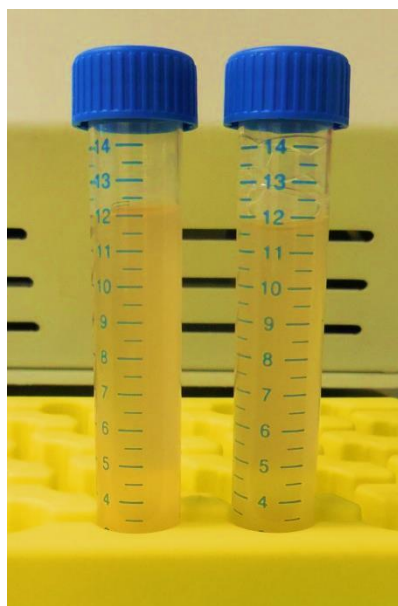
In fase di centrifugazione il braccio si dispone in posizione orizzontale, a  $90^\circ$  rispetto all'asse di rotazione. Durante la fase di decelerazione e di arresto del rotore, il braccio torna poi in posizione di riposo.

Sottoponendo campioni di sangue intero ad un processo di centrifugazione, i globuli rossi e i globuli bianchi si depositano sul fondo della Falcon lasciando in superficie il plasma contenente le piastrine, ossia il PRP (Figura 3.3).



**Figura 3.3:** Separazione tra PRP e globuli rossi a seguito della procedura di centrifugazione del sangue intero di origine bovina.

Il PRP è poi aspirato delicatamente (in modo tale da non sollecitare le piastrine ed indurne l'attivazione) tramite l'utilizzo di una pipetta di *Pasteur* e versato in una nuova Falcon conica da 15 ml (Figura 3.4).



**Figura 3.4:** PRP estratto a seguito della procedura di centrifugazione di sangue intero di origine bovina.

### 3.1.1.1 Ottimizzazione del protocollo di centrifugazione

Nella preparazione dei campioni che saranno sottoposti a PAS *assay*, è fondamentale assicurarsi che la centrifugazione elimini completamente tutti i componenti cellulari del sangue diversi dalle piastrine (come descritto nel paragrafo 2.1.4 infatti, le altre cellule ematiche influenzano il processo di coagulazione); allo stesso tempo la centrifugazione deve garantire la raccolta di un volume di PRP sufficiente per eseguire l'esperimento; il valore segnalato nei protocolli forniti dai ricercatori di Stony Brook è pari a 10 ml di PRP estratti tramite un processo di centrifugazione di 30 ml di sangue intero di origine umana.

Il protocollo di centrifugazione fornitoci indicava di eseguire un ciclo di centrifugazione imponendo un'accelerazione di 650 g per 5 minuti. Poiché il modello di centrifuga installata nel ThLab è differente rispetto a quella presente nel laboratorio di Stony Brook, e dal momento che il sangue utilizzato dai ricercatori americani è di origine umana e non bovina, tale protocollo si è rivelato inefficace, non garantendo cioè una separazione ottimale del sangue; inoltre il volume di PRP estratto non superava i 3 ml. Di conseguenza, sono state effettuate diverse prove con l'obiettivo di definire un protocollo di centrifugazione adeguato, variando di volta in volta: i) il valore dell'accelerazione (a), ii) il numero di cicli di centrifugazione successive (N) e iii) il tempo di centrifugazione (t), come riportato in Tabella 3.1.

Protocollo di Centrifugazione	a [g]	t [min]	N
Protocollo 1*	650	5	1
Protocollo 2	850	5	1
Protocollo 3	850	5	2
Protocollo 4	650	10	1
Protocollo 5	650	15	1
Protocollo 6	500	15	1

**Tabella 3.1:** Test di centrifugazione di campioni di sangue intero di origine bovina eseguiti al fine di ottimizzare il protocollo di centrifugazione. Il protocollo 1\* è il protocollo eseguito dai ricercatori americani su campioni di sangue di origine umana.

Per verificare l'efficacia di ciascun protocollo testato (Tabella 3.1) sono stati misurati:

- i) il volume di PRP estratto;
- ii) la concentrazione piastrinica, tramite l'utilizzo del *Coulter Particle Counter* (descritto nel paragrafo 3.1.3).

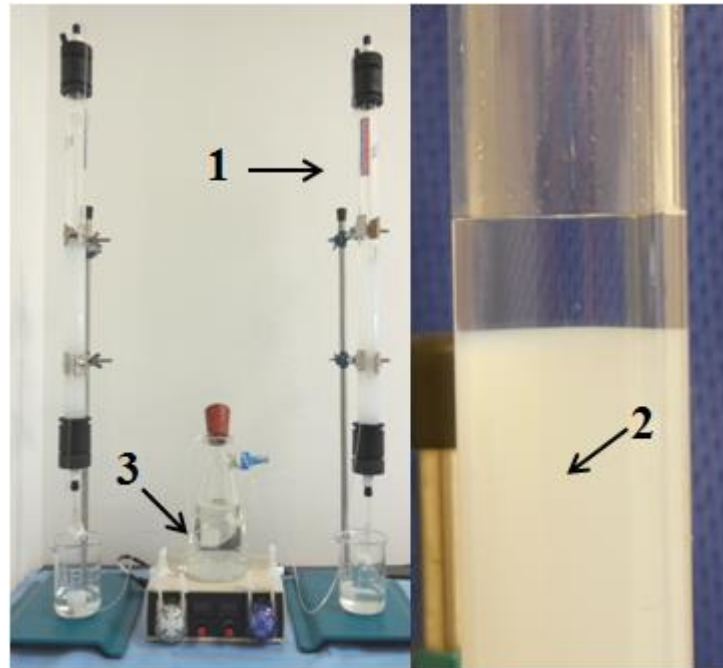
I risultati relativi all'ottimizzazione del protocollo di centrifugazione sono riportati e discussi nel Capitolo 4.

### **3.1.2 Estrazione del GFP**

Il PRP ottenuto tramite procedura di centrifugazione è successivamente processato al fine di eliminare tutte le componenti proteiche presenti nel plasma. Tale processo avviene facendo passare il PRP attraverso una colonna per filtrazione contenente un gel (Sepharose 2B, Sigma Aldrich) in grado di trattenere le proteine del plasma. La procedura di filtrazione consente di estrarre una soluzione chiamata *Gel Filtered Platelets*, (GFP), ossia il campione piastrinico su cui sarà eseguito il PAS *assay*.

Nel seguito del presente paragrafo sono riportati i protocolli sperimentali per lo svolgimento della procedura di estrazione del GFP; i protocolli per la preparazione dei vari reagenti utilizzati sono riportati in Appendice A.

Il sistema per l'estrazione del GFP (Figura 3.5) si compone di 3 elementi: i) la colonna, ii) il gel per la filtrazione e iii) due pompe peristaltiche.



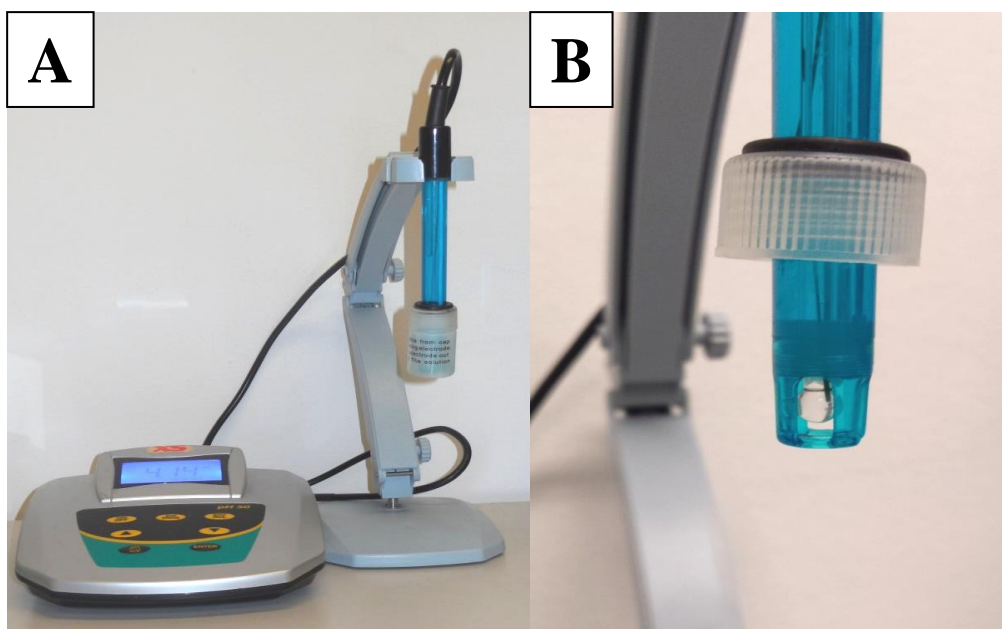
**Figura 3.5:** Sistema di filtrazione per l'estrazione del GFP: 1. Colonna in vetro. 2. Gel per filtrazione. 3. Pompe peristaltiche.

La colonna (Aqueous chromatography column, Spectra/Chrom), nella quale è inserita e fatta scorrere la soluzione di PRP da filtrare, è costituita da un cilindro in vetro all'interno della quale è impaccato il gel utilizzato per la filtrazione del PRP (descritto in seguito);. Essa è dotata di due tappi, quello superiore e quello inferiore e ciascuno di questi ha un foro a cui è collegato un tubo in teflon che funge da canale fluidico di comunicazione tra l'esterno e l'interno della colonna. Tramite il tappo superiore è inserita la soluzione di PRP e tramite quello inferiore è collezionato il GFP. Sulla base del tappo inferiore è inoltre alloggiata una membrana porosa in nylon (Woven mesh, Spectra/Chrom) con porosità pari a 10  $\mu\text{m}$ , funzionale ad impedire la fuoriuscita del gel e consentire al contempo la collezione del GFP.

Il gel per la filtrazione è costituito da sferette di agarosio, dette *beads*, con diametro compreso tra i 60 e 200  $\mu\text{m}$  (Sephacrose 2B, Sigma Aldrich) che sono impaccate all'interno della colonna. Le dimensioni dei *beads* permettono di trattenere le proteine plasmatiche presenti nel PRP favorendo invece il passaggio e la collezione delle piastrine, le quali raggiungono l'uscita della colonna più rapidamente delle proteine.

Le pompe peristaltiche collegate al canale di ingresso della colonna sono utilizzate per infondere le soluzioni di lavaggio della colonna e di conservazione dei *beads*, rispettivamente il *platelet buffer* (PB) e la soluzione di sodio azide (SA). Infatti, quando la colonna non è utilizzata, essa è riempita con SA alla concentrazione dello 0.05% in acqua bidistillata (ddH<sub>2</sub>O), battericida che funge da antimicrobico evitando la formazione di batteri all'interno dei *beads*. Nel momento in cui si vuole invece processare il PRP, il SA deve essere eliminato in quanto la sua tossicità provocherebbe la morte della piastrine. La soluzione utilizzata per il lavaggio dei *beads* è il PB, contenuto in una beuta che svolge la funzione di reservoir (Figura 3.5) in cui è immerso il tubo in teflon collegato alla pompa peristaltica ed al tappo di ingresso della colonna: la funzione della pompa è quindi quella di infondere il PB 1x nella colonna. Il PB, utilizzato alla concentrazione 1x in ddH<sub>2</sub>O, è una soluzione tampone utilizzata per mantenere le piastrine a pH fisiologico (7.4), condizione necessaria affinché le piastrine possano svolgere correttamente la loro funzione.

Il controllo del pH del PB 1x è eseguito tramite un pH-metro, apparecchio elettronico usato per misurare il pH di una soluzione. Il pH-metro in dotazione al ThLab (pH, XS Instruments, Figura 3.6 A) è un dispositivo digitale che consente di leggere su display il valore di pH rilevato da una sonda, un elettrodo a vetro (Figura 3.6 B) immerso nella soluzione in esame (il PB 1x nel nostro caso).

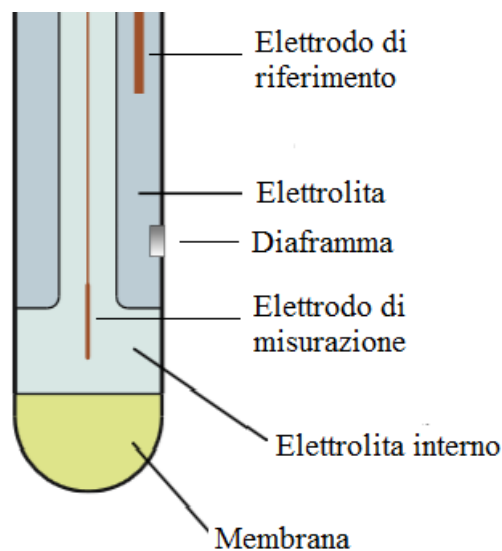


**Figura 3.6:** (A) pH-metro elettronico, (B) elettrodo a vetro.

L'elettrodo a vetro è costituito dalla combinazione di due elettrodi differenti (Figura 3.7): l'elettrodo di riferimento e quello di misurazione. L'elettrodo di misurazione misura il valore del



potenziale elettrico che dipende dal valore di pH del campione in esame; è contenuto all'interno di una soluzione elettrolitica ed è messo in contatto con il campione tramite una sottile membrana di vetro. L'elettrodo di riferimento possiede invece un potenziale costante con il quale si confronta quello rilevato dall'elettrodo di misurazione; anche l'elettrodo di riferimento è immerso in un elettrolita e risulta essere in contatto con la soluzione di interesse tramite un ponte salino (diaframma).



**Figura 3.7:** Elettrodo a vetro per la misurazione del pH.

A cavallo della sottile membrana di vetro si genera una differenza di potenziale legata alla differente concentrazione degli ioni  $H^+$  contenuti all'interno della soluzioni elettrolitica e di quella campione. La differenza di potenziale misurata è quella tra l'elettrodo di riferimento e quello di misurazione Tale differenza di potenziale è misurata da un voltmetro interno allo strumento e successivamente è convertita in un corrispondente valore di pH che è quindi visualizzato sul display.

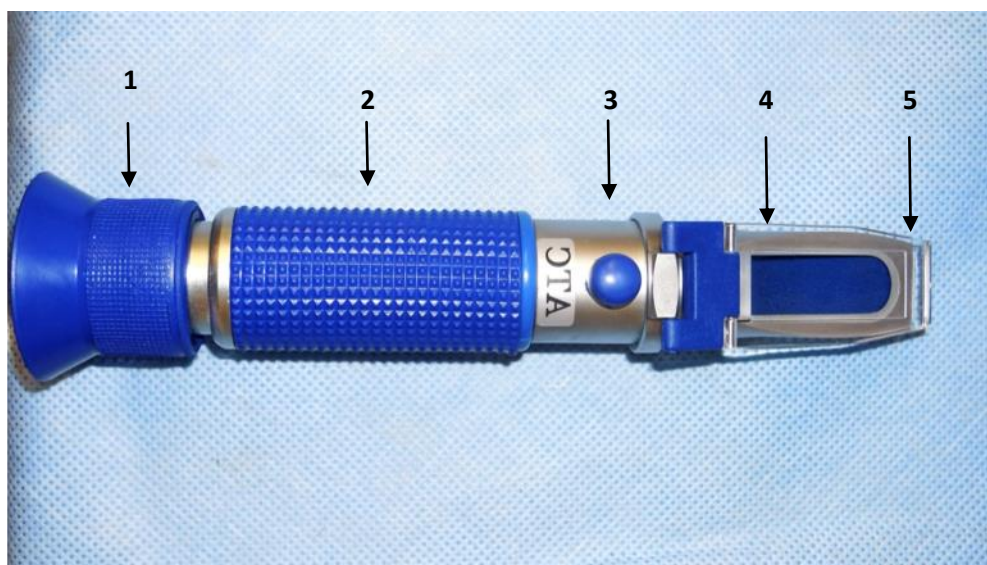
Prima di procedere con le misurazioni di pH, il pH-metro è calibrato attraverso la misura di pH di tre soluzioni campione a pH noto: la calibrazione a tre punti viene effettuata immergendo la sonda dapprima in una soluzione neutra (pH=7), successivamente in una soluzione acida (pH=4) e infine in una soluzione basica (pH= 10).

Tornando alla descrizione della procedura di estrazione del GFP, prima di inserire il PRP è dunque necessario verificare che tutto il SA sia stato eliminato dalla colonna e sostituito da PB 1x: a tale scopo si utilizza il rifrattometro, strumento ottico utilizzato per determinare l'indice di rifrazione (IR) di una soluzione, espresso in gradi di Brix.

Il rifrattometro presente nel ThLab (mod. 101 ATC, Sper Scientific) è in grado di misurare valori di IR nell'intervallo 0°-32° Brix.

Lo strumento è costituito da (Figura 3.8):

1. Oculare: sistema utilizzato per la lettura da parte dell'utente del valore di IR;
2. Tubo a specchi: specchio che dirige la luce fino al prisma;
3. Vite di regolazione: consente la messa a fuoco del sistema ottico;
4. Prisma: sul prisma è depositata una goccia della soluzione di cui si vuole misurare il valore di IR;
5. Piastra di copertura, utilizzata per ricoprire il prisma dopo la deposizione della goccia.

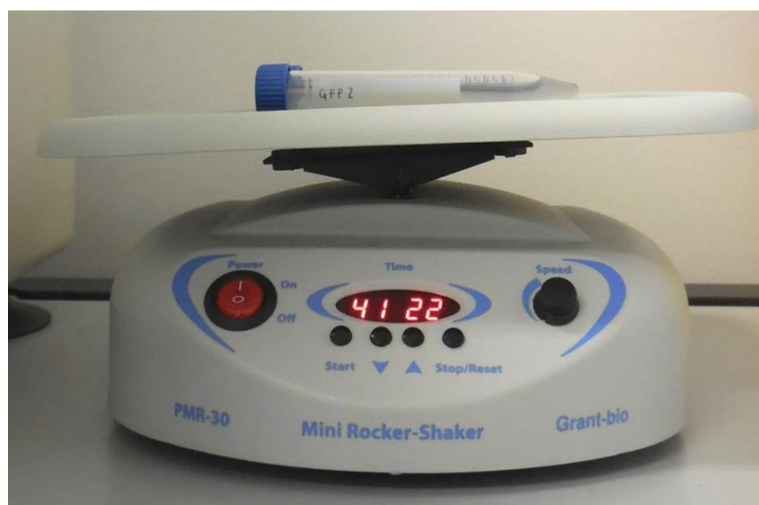


**Figura 3.8:** Refrattometro per la misurazione dell'indice di rifrazione del SA e del PB 1x.

Per effettuare una misura di IR si deposita una piccola goccia della soluzione di interesse in corrispondenza del prisma. Negli esperimenti svolti, dunque, per verificare che tutto il SA sia fuoriuscito dalla colonna e sostituito dal PB 1x, ad intervalli di tempo regolari (circa ogni 10 minuti) è valutato l'IR di una goccia di soluzione fuoriuscente dalla colonna. L'IR del SA è pari a 0, mentre quello del PB 1x è pari a 1.5: nel momento in cui il rifrattometro restituisce il valore 1.5 si può quindi procedere alla filtrazione del PRP.

Il PRP è aspirato dalla Falcon tramite una pipetta di *Pasteur* e versato delicatamente all'interno della colonna facendo attenzione a farlo scorrere lungo le pareti, per evitare che la caduta “a cascata” e l'impatto sulla superficie dei *beads* provochi attivazione piastrinica. La procedura di filtrazione ha una durata di circa 30 minuti. Durante la filtrazione si riempie un becher di acqua e lo si pone al di sotto della colonna, in corrispondenza del canale di uscita del tappo inferiore, per monitorare la densità delle gocce che fuoriescono. Infatti, nel momento in cui le piastrine iniziano ad uscire dalla colonna, si può vedere chiaramente la diffusione delle particelle all'interno del becher contenente acqua; la goccia in uscita contenente le piastrine, infatti, appare più opaca e densa rispetto all'acqua; nel momento in cui si vede la prima goccia contenente piastrine, si inizia a collezionare il GFP all'interno di una Falcon da 15 ml. Il volume di GFP raccolto deve essere circa pari al volume di PRP filtrato.

Terminata la collezione, la Falcon contenente il GFP è posta su uno shaker basculante (Mini Rocker Shaker PMR-30, Grant-Bio, Figura 3.9), in attesa di procedere con le successive fasi del test.



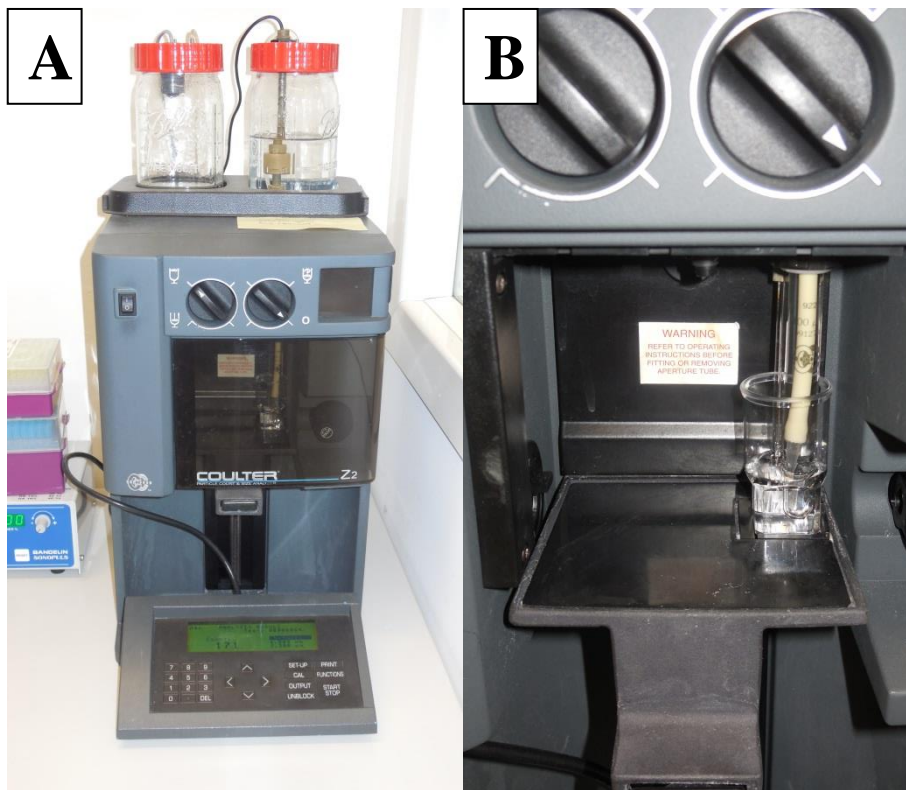
**Figura 3.9:** Shaker basculante.

Le Falcon contenenti il GFP sono mantenute sullo shaker basculante al fine di evitare l'insorgenza di fenomeni di aggregazione piastrinica; inoltre, il delicato movimento basculante è tale da non indurre attivazione piastrinica.

### 3.1.3 Conta piastrinica

A seguito della procedura di estrazione del GFP, si procede alla misura della concentrazione di piastrine in esso contenuta, mediante l'utilizzo di uno specifico contatore di particelle.

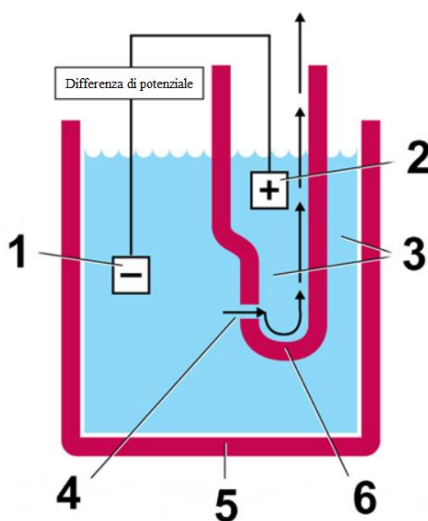
Il contatore di particelle in dotazione al ThLab (*Coulter Particle Counter Z2*, Coulter), mostrato in Figura 3.10, è uno strumento utilizzato per la conta di particelle a dimensione nota sospese in una soluzione elettrolitica. Prima di procedere con gli esperimenti, lo strumento deve essere calibrato: il *Coulter Particle Counter* è stato calibrato come riportato nel successivo paragrafo (3.1.3.1).



**Figura 3.10:** (A) *Coulter Particle Counter*, (B) *Aperture Tube* immersa in una *cup* contenente la soluzione elettrolitica di in cui è immerso il campione di GFP.

Come mostrato in Figura 3.11 B, lo strumento è dotato di un cilindro di vetro con una piccola apertura all'estremità (*Aperture Tube*) che è immerso in una *cup* contenente la soluzione elettrolitica in cui è stata dispersa una goccia di GFP. Due elettrodi, posti rispettivamente all'interno e all'esterno dell'*Aperture Tube*, permettono di applicare una differenza di potenziale a cavallo dell'apertura. La macchina è dotata di un sistema di aspirazione che forza le piastrine

disperse nella *cup* a passare attraverso l'apertura; il passaggio delle piastrine genera una variazione di impedenza che è registrata dallo strumento come un impulso di tensione o di corrente. L'ampiezza dell'impulso è direttamente proporzionale alle dimensioni della particella rilevata. Settato quindi un range di dimensioni di particelle di interesse, il *Counter* determina il numero di particelle (aventi dimensione all'interno del range settato) presenti in un determinato volume di soluzione aspirato (*Metered Volume*) contando il numero degli impulsi generati.



**Figura 3.11:** Componenti counter coulter: 1. Elettrodo negativo, 2. Elettrodo positivo, 3. Soluzione elettrolitica, 4. Apertura, 5. Cup, 6. Tubo di aspirazione del campione che viene letto.

Per effettuare la conta piastrinica con il *Coulter Particle Counter*, sono stati prelevati dalla Falcon 10  $\mu\text{l}$  di GFP e inseriti in una *coulter cup* contenente 10 ml di soluzione isotonica (soluzione fisiologica 0.9% NaCl, utilizzata come soluzione elettrolitica). Per ciascun campione di GFP letto sono state preparate due *cups* differenti e si è proceduto ad effettuare tre letture per ciascuna *cup*. I sei valori ottenuti sono stati poi mediati tra loro.

Nell'effettuare la lettura, la macchina aspira dalla *cup* un volume (*Metered Volume*) di soluzione pari a 100 $\mu\text{l}$ , restituendo il valore di piastrine contate all'interno di tale volume. Per risalire alla concentrazione, espressa in #piastrine/ $\mu\text{l}_{\text{GFP}}$ , il risultato ottenuto deve essere moltiplicato per 10.

La lettura delle due *cups* è preceduta e seguita dalla lettura del campione “bianco”, ossia soluzione fisiologica non contenente piastrine. La conta del bianco è effettuata per verificare che le particelle aspirate nelle letture precedenti non abbiano ostruito l'*Aperture Tube*; se ciò dovesse accadere (i valori letti dallo strumento sono superiori al valore tipico di lettura del bianco) prima di procedere ad una nuova conta piastrinica, l'apertura è pulita dall'operatore utilizzando una spruzzetta di acqua ultrapura e successivamente ricorrendo ad una funzione specifica dello strumento (*Flush Aperture*) che aspira dalla *cup* un volume di soluzione fisiologica maggiore di quello aspirato durante la lettura del campione, consentendo di rimuovere eventuali particelle rimaste adese all'*Aperture Tube*.

La determinazione della concentrazione delle piastrine nel GFP è necessaria per la successiva diluizione a cui sarà sottoposto il campione, procedura descritta nel paragrafo 3.1.4.

### **3.1.3.1 Calibrazione del *Coulter Particle Counter***

Prima di procedere con gli esperimenti di attivazione piastrinica, il *Coulter Particle Counter* è stato opportunamente calibrato. Per poter effettuare la procedura di calibrazione dello strumento è stato analizzato il Manuale d'uso dello stesso al fine di ricavare le informazioni di interesse circa la procedura di calibrazione. Il Manuale indicava una specifica soluzione di calibrazione, con le seguenti caratteristiche:

- i) le particelle costituenti tale soluzione sono di polistirene e devono avere un diametro compreso tra il 5 e il 20% del diametro dell'*Aperture Tube* (che nel nostro caso risulta essere di 100  $\mu\text{m}$ );
- ii) la concentrazione delle particelle in tale soluzione è  $2 \times 10^6$  particelle/ml.

Poiché tale soluzione di calibrazione non era presente in laboratorio, è stato deciso di preparare una soluzione di calibrazione che presentasse le medesime caratteristiche. Il soluto scelto è stato l'Orgasol, composto da particelle sferiche di Poliammide con un diametro di  $10 \pm 2 \mu\text{m}$  (dimensioni pari al 10% dell'*Aperture Tube*), che è stato sospeso in soluzione fisiologica attraverso l'uso di poche gocce di Triton-X, un tensioattivo non ionico che consente di sospendere più facilmente l'Orgasol, impedendo la formazione di aggregati di particelle. La procedura di calibrazione a un punto prevista dallo strumento richiede che siano inserite 5 gocce della soluzione di Orgasol all'interno di 20 ml di soluzione fisiologica presenti in una *cup*. La soluzione così preparata è posizionata all'interno dello strumento e sono settati i parametri di calibrazione, quali la dimensione delle particelle disperse nella soluzione che sarà analizzata dallo strumento. Al termine

della procedura di calibrazione lo strumento calcola la costante di calibrazione ( $K_d$ ), che è salvata e memorizzata.

Per effettuare la calibrazione del *Coulter Particle Counter* è stata inizialmente preparata la soluzione di calibrazione come descritto dal Manuale dello strumento: tale soluzione (Cal<sub>5gocce</sub>, 5 gocce della soluzione di Orgasol disperse in 20 ml di fisiologica) risultava avere una concentrazione di particelle pari a 10 particelle/ $\mu$ l. Durante il primo tentativo di calibrazione, però, lo strumento ha segnalato una concentrazione di particelle troppo bassa, impedendo di procedere con la calibrazione. Pertanto è stata preparata una nuova soluzione (Cal<sub>6gocce</sub>) aggiungendo un'ulteriore goccia di soluzione di Orgasol alla soluzione di calibrazione: anche in questo caso la calibrazione non è andata a buon fine, a causa della concentrazione troppo bassa di particelle. Procedendo poi all'aggiunta di un'ulteriore goccia, in queste condizioni (soluzione Cal<sub>7gocce</sub>, contenente 14 particelle/ $\mu$ l) è stato possibile completare la procedura di calibrazione.

Per verificare che lo strumento fosse calibrato correttamente si è proceduto ad una verifica della calibrazione: sono state preparate 6 soluzioni a concentrazione di Orgasol nota (Tabella 3.2) e per ciascuna di queste si è proceduto ad effettuare una misura della loro concentrazione attraverso lo strumento. Per ciascuna soluzione sono state effettuate cinque letture, i cui risultati sono stati mediati.

Soluzione	Concentrazione [#particelle/ $\mu$ l]
Cup <sub>2x10<sup>3</sup></sub>	2x10 <sup>3</sup>
Cup <sub>1x10<sup>4</sup></sub>	1x10 <sup>4</sup>
Cup <sub>2x10<sup>4</sup></sub>	2x10 <sup>4</sup>
Cup <sub>5x10<sup>4</sup></sub>	5x10 <sup>4</sup>
Cup <sub>1x10<sup>5</sup></sub>	1x10 <sup>5</sup>
Cup <sub>2x10<sup>5</sup></sub>	2x10 <sup>5</sup>

**Tabella 3.2:** Soluzioni a concentrazione nota preparate per verificare la calibrazione effettuata.

I risultati della verifica della calibrazione sono riportati e discussi nel Capitolo 4.

### 3.1.4 Preparazione del campione per l'esperimento

Il campione piastrinico (GFP) da sottoporre a stimolazione (identificato come campione EXP) è preparato in modo tale che la sua concentrazione sia di  $20 \times 10^3$  piastrine/ $\mu\text{l}$ ; l'utilizzo di un campione EXP che abbia sempre la stessa concentrazione piastrinica consente di confrontare i risultati del PAS *assay* ottenuti in esperimenti differenti.

Per ottenere la concentrazione desiderata è necessario diluire il GFP (che ha tipicamente una concentrazione molto superiore alle  $20 \times 10^3$  piastrine/ $\mu\text{l}$ ) e tale diluizione è effettuata con PB 1x e  $\text{CaCl}_2$  50 mM, sale che in ambiente acquoso si dissocia nei due costituenti,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$ : quest'ultimo è uno ione essenziale alla base dei processi che portano alla produzione di fibrina da parte delle piastrine attivate.

Il volume di EXP (X ml) da preparare è stabilito in base allo specifico esperimento da condurre (numero di campioni da sollecitare). Le quantità relative di GFP, PB 1x e  $\text{CaCl}_2$  50 mM per la preparazione dell'EXP sono calcolate in base alle formule riportate in Tabella 3.3.

EXP [ml]	GFP [ml]	50 mM $\text{CaCl}_2$ [ml]	PB 1X [ml]
X	$\frac{20 \times 10^3}{\text{piastrine}/\mu\text{GFP}} \times X$	$0.060 \times X$	$X - \text{GFP} - 50 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$

**Tabella 3.3:** Equazioni per il calcolo dei reagenti che costituiranno l'EXP.

Il campione piastrinico EXP così preparato, che ha una concentrazione piastrinica nota e pari a  $20 \times 10^3$  piastrine/ $\mu\text{l}$ , è il campione piastrinico che viene sottoposto a stimolazione e successivamente analizzato attraverso analisi spettrofotometrica.

Nell'ambito del presente lavoro di tesi, il cui obiettivo è l'ottimizzazione del protocollo per il PAS *assay* non si è proceduto a stimolare in HSD i campioni sottoposti al saggio. Per stimolare meccanicamente i campioni piastrinici analizzati nel corso degli esperimenti, ed indurne quindi l'attivazione, si è proceduto a sottoporli a sonicazione, procedura descritta nel paragrafo seguente.



### 3.1.5 Sonicazione

A seguito della preparazione dell'EXP si procede con la sonicazione delle piastrine al fine di indurne l'attivazione (meccanica). Negli esperimenti in cui i campioni piastrinici sono stimolati in HSD (o con altri strumenti in grado di sollecitare meccanicamente le piastrine), la sonicazione consente di valutare quale sia il valore di massima attivazione ottenibile dal campione piastrinico e poterlo così confrontare con il livello di attivazione indotto dalla specifica stimolazione (es.: curve di sforzo di taglio ricavate dall'analisi CFD di un dispositivo oggetto di studio). In dettaglio, il valore di attivazione ottenuto dal campione stimolato è normalizzato rispetto al valore ottenuto con il campione sonicato ed espresso in percentuale rispetto ad esso.

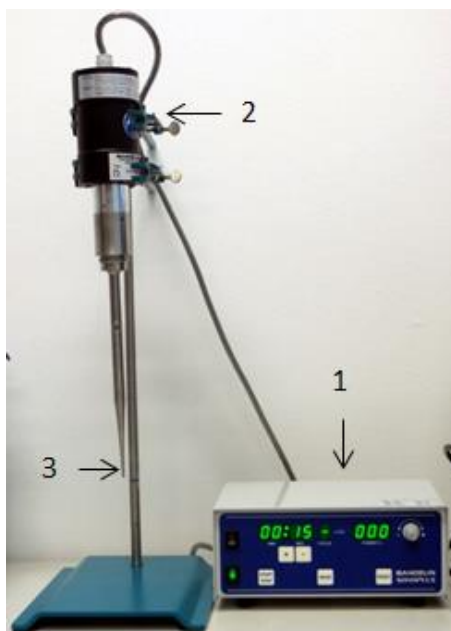
Le campagne sperimentali di sonicazione da noi svolte hanno avuto, in realtà, un duplice obiettivo. Innanzitutto, come anticipato, la sonicazione rappresenta la fase di stimolazione meccanica eseguita nel corso dei nostri esperimenti. Per tale motivo, si è proceduto ad eseguire diversi test di sonicazione, volti all'ottenimento di differenti campioni piastrinici stimolati da sottoporre all'analisi spettrofotometrica. In tal modo si è potuto verificare la correttezza delle procedure sperimentali da noi adottate nell'esecuzione del PAS *assay* in termini di utilizzazione dei vari strumenti e preparazione dei reagenti chimici.

In secondo luogo, in previsione di futuri esperimenti da condursi nel ThLab, che plausibilmente prevederanno una fase di stimolazione meccanica tramite HSD (o altri strumenti), le campagne sperimentali di sonicazione (i dettagli dei vari test eseguiti sono forniti nel prossimo paragrafo, Ottimizzazione del protocollo di stimolazione) hanno avuto anche lo scopo di determinare quale sia il set di parametri di sonicazione (relativamente allo specifico modello di sonicatore presente nel ThLab) che consenta di stimolare le piastrine sino ad ottenere il loro massimo livello di attivazione.

La procedura di sonicazione viene effettuata utilizzando uno specifico strumento, il sonicatore a sonda, in grado di attivare le piastrine per mezzo di ultrasuoni, onde di espansione e compressione con frequenza dell'ordine delle decine di kHz. Quando gli ultrasuoni si propagano nei liquidi creano le condizioni necessarie per favorire alcuni fenomeni fisici, quali la cavitazione. Tipicamente la cavitazione è un processo nucleato in quanto si presenta nei punti deboli preesistenti nel liquido, quali le microbolle. Non appena la bolla di cavitazione si viene a trovare sotto l'influenza della compressione di un'onda sonora, la pressione circostante, la tensione superficiale del liquido che circonda la bolla e la pressione negativa all'interno della bolla di cavitazione contribuiscono al suo violento collasso e tale fenomeno induce un elevato livello di attivazione delle piastrine.

Come mostrato in Figura 3.12, il sonicatore in dotazione al ThLab (BANDELIN SONOPULS, HD 2070) è costituito da:

1. Generatore di corrente: fornisce impulsi di energia ad alta tensione e ad alta frequenza, trasformando la normale corrente alternata a 50 Hz in energia elettrica a 20 KHz.
2. Convertitore: trasforma l'energia elettrica ad alta frequenza proveniente dal generatore in vibrazione meccanica alla frequenza specifica (20 kHz). L'oscillazione dei cristalli piezoelettrici del convertitore è trasmessa e concentrata grazie all'azione della sonda.
3. Sonda: amplifica la vibrazione longitudinale prodotta dal convertitore producendo una più intensa azione di cavitazione e una maggiore efficacia del processo.



**Figura 3.12:** Sonicatore a sonda: sono mostrati in ordine il generatore (1), il convertitore (2) e la sonda (3).

Gli esperimenti di sonicazione prevedono la stimolazione di aliquote di 350  $\mu$ l di EXP contenute all'interno di *vials* eppendorf da 1.5 ml.

### **3.1.5.1 Ottimizzazione del protocollo di sonicazione**

Con riferimento agli obiettivi dichiarati nel paragrafo precedente - i) ottenimento di campioni piastrinici stimolati attraverso cui validare le procedure da noi adottate per lo svolgimento del PAS *assay* e ii) identificazione del set di parametri di sonicazione ottimale da adottare nello svolgimento dei test di attivazione piastrinica - sono state eseguite diverse prove di sonicazione di campioni di EXP.

I risultati delle diverse prove hanno consentito di determinare il protocollo di sonicazione che induce il livello massimo di attivazione ottenibile con campioni piastrinici di sangue bovino. Allo stesso tempo però, il protocollo di sonicazione è stato valutato in funzione del fatto che la sonicazione deve poter preservare l'integrità e la vitalità delle piastrine sollecitate, ossia non deve determinarne la rottura.

Il sonicatore in dotazione al ThLab è in grado di erogare una potenza massima di 70W ed il valore minimo di potenza impostabile è pari al 10% della potenza massima ottenibile (7W).

L'ottimizzazione del protocollo di sonicazione ha previsto due fasi sperimentali distinte:

- i) Fase I: scelta del valore di potenza con cui stimolare le piastrine al fine di ottenere il massimo livello di attivazione (il valore è settato tramite i controlli presenti sul generatore);
- ii) Fase II: individuazione dell'intervallo di tempo ottimale di applicazione dello stimolo (il tempo di applicazione è settato tramite i controlli presenti sul generatore).

Nello svolgimento della Fase I, fissato il tempo di stimolazione pari a 10 sec (dato fornitoci dai ricercatori di Stony Brook come valore ottimale per la stimolazione di campioni piastrinici di origine umana), sono stati testati cinque differenti livelli di potenza dello strumento. I protocolli di sonicazione adottati sono riportati in Tabella 3.4.

<b>Protocollo di sonicazione</b>	<b>Potenza [%]</b>	<b>Potenza [W]</b>	<b>Tempo [s]</b>
S1 <sub>10s</sub>	10	7	10 <sup>(*)</sup>
S2 <sub>10s</sub>	30	21	10 <sup>(*)</sup>
S3 <sub>10s</sub>	50	35	10 <sup>(*)</sup>
S4 <sub>10s</sub>	75	52.5	10 <sup>(*)</sup>
S5 <sub>10s</sub>	100	70	10 <sup>(*)</sup>

**Tabella 3.4:** Protocolli di sonicazione di campioni piastrinici eseguiti al fine di scegliere il valore di potenza ottimale con il quale stimolare le piastrine. La durata dello stimolo applicato, pari a 10 s<sup>(\*)</sup>, corrisponde al valore utilizzato dai ricercatori americani durante lo svolgimento del test su campioni di origine umana.

A seguito della procedura di sonicazione, oltre al livello di attivazione delle piastrine (trombina prodotta dalle piastrine stimolate attraverso lettura in spettrofotometria), è stata misurata la concentrazione piastrinica del campione (attraverso l'utilizzo del *Coulter Particle Counter*) al fine di determinare se la stimolazione adottata avesse comportato la rottura delle cellule.

Nella Fase II di studio, fissata l'intensità di stimolazione pari al 10% della potenza massima dello strumento, sono stati valutati tempi di applicazione dello stimolo variabili tra i 3 e i 30 secondi. I protocolli di sonicazione eseguiti sono riportati in Tabella 3.5.

<b>Protocollo di sonicazione</b>	<b>Potenza [%]</b>	<b>Potenza [W]</b>	<b>Tempo [s]</b>
S1 <sub>3s</sub>	10	7	3
S1 <sub>5s</sub>	10	7	5
S1 <sub>7s</sub>	10	7	7
S1 <sub>10s</sub>	10	7	10
S1 <sub>15s</sub>	10	7	15
S1 <sub>20s</sub>	10	7	20
S1 <sub>30s</sub>	10	7	30

**Tabella 3.5:** Protocolli di sonicazione di campioni piastrinici eseguiti al fine di individuare l'intervallo di tempo ottimale di applicazione dello stimolo.

Anche in questo caso, a seguito della procedura di sonicazione, sono stati valutati il livello di attivazione piastrinica e la concentrazione piastrinica di ciascun campione.

I risultati relativi ai diversi protocolli di sonicazione sono riportati e discussi all'interno del Capitolo 4.

### 3.1.6 Lettura spettrofotometrica

Terminata la sonicazione, sono prelevati 25  $\mu$ l dal campione contenente le piastrine stimulate e sono aggiunti i seguenti reagenti, funzionali a consentire alle piastrine di produrre la trombina, in accordo con il metodo della protrombina acetilata (che elimina il meccanismo di feedback positivo fisiologico), descritto nel paragrafo 2.3.1.2:

1. Ac-FII: necessaria, come detto, per eliminare il meccanismo di feedback che causerebbe ulteriore attivazione nelle piastrine (il protocollo di acetilazione per l'ottenimento di Ac-FII è riportato nel dettaglio nel prossimo paragrafo). Eliminato tale meccanismo, è possibile ottenere una dipendenza lineare tra attivazione piastrinica e generazione di trombina. Ac-FII conservata alla temperatura di  $-30^{\circ}\text{C}$  in aliquote da 15 $\mu$ l, deve essere diluita in HBS:BSA-PEG in rapporto 1:4 ; il volume di Ac-FII + HBS:BSA-PEG necessario per la lettura in spettrofotometro di un singolo campione stimolato è 10  $\mu$ l.
2.  $\text{Ca}^{2+}$ : ione essenziale alla base dei processi che portano alla coagulazione piastrinica. Per ciascun campione sono aggiunti 10  $\mu$ l di  $\text{CaCl}_2$  50 mM.
3. FXa: permette la generazione del complesso protrombinase che converte il Ac-FII in trombina acetilata (Ac-FIIa). Il volume di FXa necessario per ogni campione è 5  $\mu$ l.

Ac-FII,  $\text{Ca}^{2+}$  e FXa sono precedentemente inseriti in una soluzione tampone contenente HEPES 20 mM, NaCl 130 mM e albumina di siero bovino (BSA) allo 0.1% (HBS:BSA, 50  $\mu$ l per ciascun campione); la miscela di tali reagenti è denominata *Tube*.

Il campione (EXP sonicato + *Tube*) è successivamente incubato per 10 minuti in bagno termostato a  $37^{\circ}\text{C}$  al fine di permettere la reazione di produzione del FIIa. Il bagno termostatico in dotazione al ThLab (VWR, VWB 6, Figura 3.13), all'interno del quale vengono incubati i campioni piastrinici (EXP sonicato + *Tube*), è costituito da una vasca in acciaio inox contenente acqua termostata alla temperatura di  $37^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.13:** Bagno termostatico.

Terminata la fase di incubazione, sono prelevati 10  $\mu\text{l}$  da ogni campione e posti in un pozzetto dello spettrofotometro, caricato precedentemente con una soluzione, denominata *Well*, contenente:

1. CH-TH sciolta in una soluzione di NaCl 0.15 M: è il cromoforo utilizzato per quantificare l'attivazione piastrinica generata dalle sollecitazioni prodotte sulle piastrine. Tale cromoforo è tagliato dal Ac-FIIa in un residuo peptidico e nel 4-nitraniline; nel momento in cui le piastrine risultano effettivamente attivate e producono trombina, il cromoforo emette un'onda luminosa la cui assorbanza è misurata alla lunghezza d'onda di 405 nm dallo spettrofotometro.
2. HBS:BSA + acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 5 mM (HBS:BSA-EDTA): durante la lettura in spettrofotometria la reazione di conversione del FII in FIIa è fermata grazie al sequestro del  $\text{Ca}^{2+}$  da parte dell'EDTA. In tal modo è rilevata solo la trombina generata durante i dieci minuti di incubazione nel bagno termostato a 37°C.

La lettura spettrofotometrica, ultima fase del PAS *assay*, è eseguita come descritto qui di seguito.

Da ogni campione (EXP + *Tube* post incubazione a 37°C) si prelevano 10  $\mu\text{l}$  di soluzione che sono inseriti in un pozzetto dello spettrofotometro, all'interno del quale erano stati precedentemente inseriti 150  $\mu\text{l}$  della soluzione denominata *Well* e si procede con la lettura. L'analisi spettrofotometrica permette la quantificazione dell'attivazione piastrinica dei campioni stimolati: tale analisi rileva la dinamica della variazione del valore di assorbanza del campione durante un intervallo di tempo prestabilito. La pendenza della curva (che ha andamento lineare) descrive la

variazione di assorbanza nel tempo ed è un indice della quantità di trombina prodotta dal campione, ossia del livello di attivazione dal campione piastrinico in esame.

Per condurre l'analisi spettrofotometrica del campione piastrinico si ricorre allo spettrofotometro, uno strumento che misura l'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche monocromatiche nel campo del visibile o dell'ultravioletto da parte di molecole. Lo spettrofotometro in dotazione al ThLab (Thermo Scientific, Multiskan FC, Figura 3.14) è composto da:

1. Sorgente luminosa: costituita da una lampada alogena al quarzo;
2. Monocromatore: elemento che lascia passare solo la lunghezza d'onda impostata dall'operatore;
3. Pozzetti di lettura: consentono l'alloggiamento della soluzione da analizzare;
4. Rivelatore: converte la radiazione elettromagnetica in un segnale elettrico;
5. Amplificatore: amplifica il segnale elettrico in uscita dal rivelatore;
6. Registratore: fornisce il valore di assorbanza misurato durante la lettura dei pozzetti.



**Figura 3.14:** Sistema di lettura spettrofotometrica: lo spettrofotometro è collegato ad un computer che tramite software permette di effettuare le misurazioni di assorbanza dei campioni piastrinici.

Lo spettrofotometro è collegato ad un computer ed attraverso un software dedicato è possibile settare i parametri di processo e monitorare in tempo reale la dinamica della variazione di assorbanza del campione. La lettura in spettrofotometria è effettuata impostando i parametri riportati in Tabella 3.6 (in accordo con quanto riportato nei protocolli ricevuti dai ricercatori dell'Università di Stony Brook):

<b>Numero di letture</b>	240
<b>Intervallo tra due letture [s]</b>	2
<b>Lunghezza d'onda [nm]</b>	405
<b>Modalità di lettura</b>	cinetica

**Tabella 3.6:** Parametri di lettura dello spettrofotometro.

La lunghezza d'onda impostata è di 405 nm poiché il CH-TH emette a tale lunghezza d'onda in presenza di trombina. I valori di numero di letture ed intervallo tra due letture successive impostati determinano una durata della lettura pari a 8 min, tempo caratteristico della dinamica della reazione tra CH-TH e Ac-FIIa: in tal modo è possibile monitorare l'intera dinamica della reazione.

Al termine di ciascuna lettura è calcolato il coefficiente angolare della retta interpolante i punti assorbanza-tempo. Tale valore rappresenta l'effettivo indice che quantifica il livello di attivazione delle piastrine.

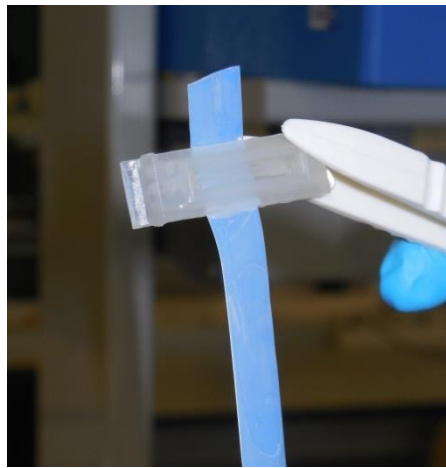
### 3.1.7 Acetilazione della protrombina

L'acetilazione della protrombina (FII) è un passaggio fondamentale per la buona riuscita del PAS assay. Come riportato nel paragrafo 2.4.1.2, l'utilizzo della trombina acetilata è necessario al fine di ottenere una valutazione diretta ed univoca del legame tra gli sforzi meccanici subiti dalle piastrine e il loro livello di attivazione. Il processo di acetilazione del FII permette infatti di eliminare il feedback positivo della trombina fisiologica che, comportandosi da agonista chimico, comporta un ulteriore incremento del livello di attivazione delle piastrine. E' ritenuto quindi utile riportare i dettagli del protocollo al fine di consentire la piena comprensione di tale processo.

Il protocollo di acetilazione del FII prevede una procedura che si articola in tre distinte fasi, con durata totale del protocollo pari a tre giorni: le prime due fasi (giorno 1 e giorno 2) prevedono di effettuare due successive dialisi del FII con due differenti soluzioni dializzanti; al termine delle due dialisi (fase 3, giorno 3), si procede con l'analisi di verifica dell'avvenuta acetilazione.

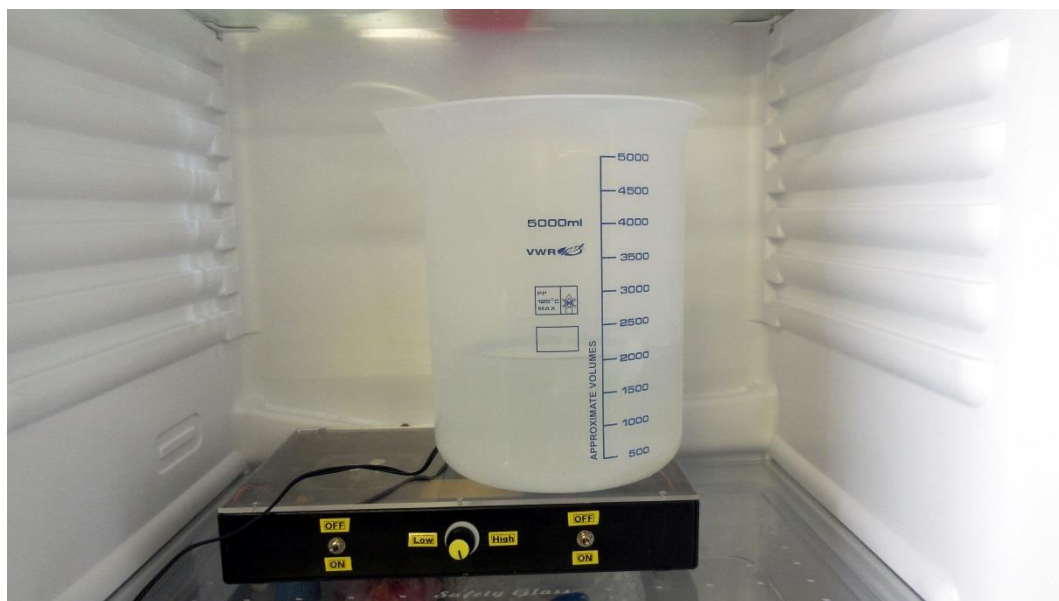


1. Fase 1 (giorno 1): è preparata la prima soluzione dializzante composta da 2 L di 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ /1 mM EDTA, inserita all'interno di un becher da 5 L, e posta in frigo alla temperatura di 4°C fino al suo utilizzo. Successivamente, è scongelata 1 aliquota da 1 ml di protrombina (concentrazione iniziale pari a 8.7 mg/ml, corrispondente ad una concentrazione molare di 121  $\mu\text{M}$ , come riportato sulla scheda del prodotto) e diluita con 6 ml di 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ /1 mM EDTA. Quest'ultima soluzione è inserita all'interno di tubi per dialisi (Spectra/Por Biotech Dialysis Membranes, Figura 3.15) in grado di trattenere particelle con peso molecolare superiore agli 8-10 KD, che sono successivamente immersi nel becher contenente la soluzione dializzante.



**Figura 3.15:** Tubi per dialisi utilizzati per inserire il FII.

Il becher, al cui interno è inserito un agitatore magnetico, è posto quindi in frigo (4°C) sopra una piastra magnetica (Figura 3.16) che mantiene in agitazione la soluzione dializzante durante tutta la notte.



**Figura 3.16:** Il becher contenente la soluzione dializzante in cui sono immersi i tubi contenenti il FII, è posto su agitatore magnetico e mantenuto in frigorifero alla temperatura di 37°C per tutta la notte.

2. Fase 2 (giorno 2): il mattino successivo, è preparata una seconda soluzione dializzante, composta da 2 L di 0.15 M NaCl/1 mM EDTA/1 mM MES che è inserita all'interno di un becher da 5 L e posta in frigo (4°C) fino al suo utilizzo. Il FII sottoposto alla prima fase di dialisi è rimosso dai tubi dializzanti ed inserito in una Falcon da 15 ml (Figura 3.17), mantenuta a temperatura ambiente (22-23° C) per qualche minuto per consentire al FII di scaldarsi.



**Figura 3.17:** Inserimento della soluzione dializzata nella Falcon da 15 ml.

La Falcon è quindi posta su una bilancia e, attraverso la misurazione del peso, è stato determinato il volume del FII. Tale valore è stato poi, portato a 9.7 ml con l'aggiunta del volume necessario di 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ /1 mM EDTA. Dopo aver inoltre aggiunto 200  $\mu\text{l}$  di 50 mM  $\text{CaCl}_2$  e 100  $\mu\text{l}$  di 300 mM SNSA precedentemente disciolto in DMSO (in agitazione a temperatura di 37°C), la soluzione è stata lasciata riposare per 20 minuti. Trascorso tale tempo sono stati aggiunti 200  $\mu\text{l}$  di 2 M Trizma-HCl e 200  $\mu\text{l}$  di 0.2 M EDTA. La soluzione così ottenuta è inserita nuovamente all'interno di tubi per dialisi che vengono immersi nella seconda soluzione dializzante. Il Becher è posto quindi in frigo

sulla piastra magnetica che mantiene in agitazione la soluzione dializzante durante tutta la notte.

3. Fase 3 (giorno 3): rimosso il FII dializzato, ovvero acetilato (Ac-FII) dai tubi ed inserito in una Falcon, ne è stato calcolato il volume tramite misurazione del peso. Attraverso uno spettrofotometro è stata misurata l'assorbanza, alla lunghezza d'onda di 280 nm ( $A_{280}$ ), del FII dializzato e della soluzione dializzante (NaCl/EDTA/MES) ed è stata poi calcolata la differenza tra questi due valori ( $net A_{280}$ ). Tale misura è stata svolta presso i Laboratori del Dipartimento di Chimica del Politecnico di Milano. Per determinare se la procedura di dialisi ha portato ad una efficace acetilazione del FII, è stata calcolata la concentrazione micromolare del Ac-FII ( $C$ , eq. 3.1): tale valore è stato poi confrontato con il valore segnalato nei protocolli forniti dai ricercatori di Stony Brook ( $10 \mu\text{M}$ ):

$$C = net A_{280} / (1.30 \times 0.072) \quad (3.1)$$

I risultati ottenuti sono riportati nel Capitolo 4.

# Capitolo 4

## Risultati

### 4.1 Definizione del protocollo di centrifugazione dei campioni di sangue intero

La procedura di centrifugazione cui sono sottoposti i campioni di sangue bovino intero garantisce la separazione fisica tra il PRP e le altre componenti ematiche. La procedura di centrifugazione è considerata efficace nel momento in cui: i) assicura che il PRP ottenuto non presenti al suo interno residui di altre cellule ematiche; ii) consenta di collezionare un volume di PRP sufficiente per eseguire l'esperimento, ovvero circa 10 ml, con una adeguata concentrazione piastrinica; iii) non attivi le piastrine a causa della sollecitazione meccanica indotta dall'accelerazione imposta dallo strumento.

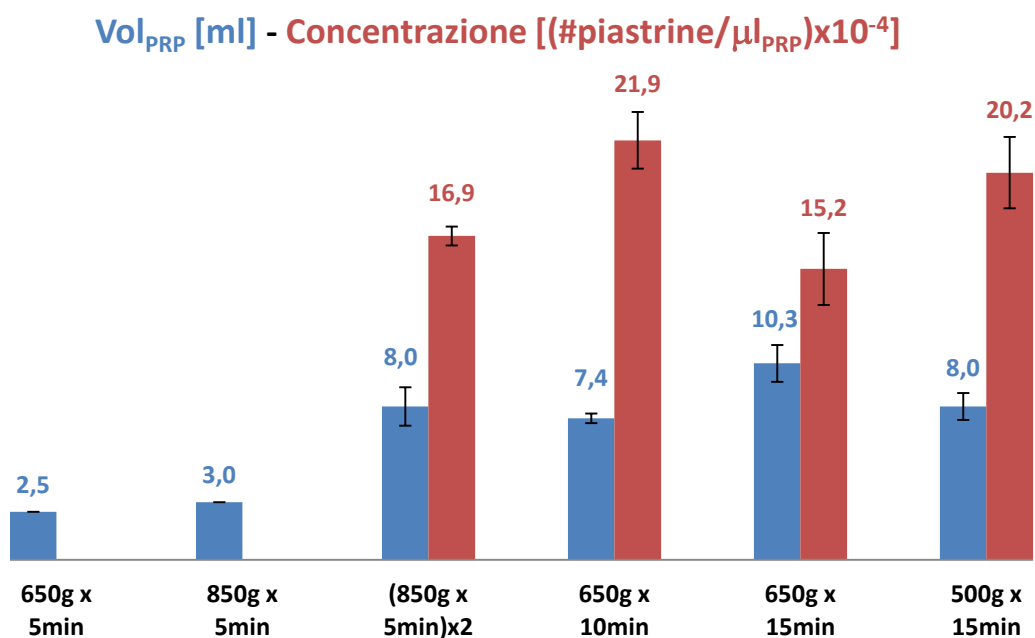
Al fine di individuare il set di parametri che garantisca una centrifugazione efficace, sono stati testati diversi protocolli di centrifugazione (Capitolo 3, paragrafo 3.3.1.1), riportati in Tabella 4.1.

Al termine di ciascuna centrifugazione, si è proceduto in primo luogo all'ispezione visiva dei campioni, osservando in particolare il colore del PRP al fine di verificare l'assenza di residui ematici diversi dalle piastrine: il PRP è caratterizzato, infatti, da un colore giallo paglierino uniforme. Successivamente si è misurato il volume di PRP raccolto e la sua concentrazione, attraverso il *Coulter Particle Counter*.

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4.1 e riassunti nel grafico in Figura 4.1.

Protocollo di Centrifugazione	a[g]	t[ $\text{min}$ ]	N	#Campioni	Vol <sub>PRP</sub> [ml]	Concentrazione [(#piastrine/ $\mu\text{l}_{\text{PRP}}$ ) $\times 10^{-4}$ ]
Protocollo 1*	650	5	1	1	2.5	nd
Protocollo 2	850	5	1	1	3.0	nd
Protocollo 3	850	5	2	2	8.0 $\pm$ 1.0	16.4 $\pm$ 0.2
Protocollo 4	650	10	1	4	7.4 $\pm$ 0.2	21.9 $\pm$ 1.4
Protocollo 5	650	15	1	4	10.2 $\pm$ 0.1	15.2 $\pm$ 1.9
Protocollo 6	500	15	1	4	8.0 $\pm$ 0.7	20.2 $\pm$ 1.9

**Tabella 4.1:** Valori medi  $\pm$  deviazione standard di volume di PRP e concentrazione di piastrine/ $\mu\text{l}_{\text{PRP}}$  (cinque letture per ciascun campione) calcolati per ciascuno dei diversi protocolli di centrifugazione testati. nd: indica misura di concentrazione non eseguita dato il valore di Vol di PRP molto basso.



**Figura 4.1:** Volume di PRP e concentrazione di piastrine/ $\mu\text{l}_{\text{PRP}}$  ottenuti a seguito delle diverse procedure di centrifugazione.

L'analisi dei dati di Figura 4.1 indica che i protocolli 1\* e 2 non garantiscono una separazione efficace del sangue: il Vol di PRP ottenuto, pari, rispettivamente, a 2.5 e 3 ml, non consente, infatti, l'esecuzione del PAS *assay*; essendo quindi il Vol assolutamente inadeguato, non si è proceduto alla misura della concentrazione piastrinica. Inoltre, il PRP ottenuto con entrambi i protocolli presentava un colore rosastro, indice della presenza di globuli rossi residui al suo.

I protocolli 3-6 forniscono invece dei risultati validi in termini di Vol di PRP ottenuto; inoltre, i valori di Vol misurati sono confrontabili tra loro. Con l'obiettivo però di identificare un protocollo cautelativo in termini di sollecitazione indotta sulle piastrine, si è deciso di utilizzare il protocollo 6 come protocollo definitivo per i nostri esperimenti. Il protocollo 6 prevede infatti l'applicazione di un solo ciclo di centrifugazione ( $N_6 = 1$ ) al più basso valore di accelerazione ( $a_6 = 500g$ ) tra quelli testati. Per quanto riguarda il tempo di centrifugazione ( $t_6 = 15$  min), valore più alto rispetto ad esempio al protocollo 4 ( $t_4 = 10$  min), questo non determina un maggiore stress per le piastrine, che sono invece molto più sensibili al valore di  $a$ . Il protocollo 6 fornisce inoltre un Vol di PRP ( $\text{Vol PRP}_6 = 8$  ml) che seppur minore rispetto ad esempio al Vol ottenibile con il protocollo 5 ( $\text{Vol PRP}_5$  superiore a 10 ml), è assolutamente adeguato ai fini dell'esperimento in quanto caratterizzato da un'elevata concentrazione piastrinica interna (superiore in media a  $20 \times 10^4$  piastrine/ $\mu\text{l}_{\text{PRP}}$ ).

A tal proposito si deve considerare che l'efficienza, in termini di collezione di piastrine, della colonna per la filtrazione utilizzata per collezionare il GFP a partire dal PRP, è di circa del 50%; ciò significa che, nonostante il volume di GFP raccolto è pari al volume di PRP inserito, circa la metà delle piastrine contenute nel PRP è trattenuta in colonna e di conseguenza la concentrazione di piastrine nel GFP si riduce a circa la metà rispetto a quella di partenza. La scelta del protocollo 6 di centrifugazione garantisce quindi un valore di concentrazione del PRP tale da permettere, anche a seguito della filtrazione, di ottenere campioni di GFP con elevata concentrazione piastrinica che potranno poi essere diluiti per ottenere la concentrazione desiderata di  $20 \times 10^3$  piastrine/ $\mu\text{l}_{\text{GFP}}$  nel campione EXP (Capitolo 3, paragrafo 3.1.4).

## **4.2 Calibrazione del *Coulter Particle Counter***

Il *Coulter Particle Counter* richiede che venga eseguita una procedura di calibrazione al fine di poter eseguire le misure in modo accurato. Tale procedura è eseguita effettuando una calibrazione ad un punto, pertanto risulta essere fondamentale la scelta del punto su cui effettuare la calibrazione dello strumento.

Come descritto nel paragrafo 3.1.3.1, è stato possibile portare a termine la procedura di calibrazione utilizzando la soluzione Cal<sub>7gocce</sub>, ovvero la soluzione in cui 7 gocce della soluzione di Orgasol sono state disperse in 20 ml di soluzione fisiologica.

Per verificare che la calibrazione fosse stata eseguita in maniera corretta, e che lo strumento fosse in grado di eseguire misure di concentrazioni accurate, sono state analizzate 6 diverse soluzioni di Orgasol, ciascuna con un diverso valore di concentrazione. Per ciascuna delle soluzioni sono state effettuate cinque letture ed i risultati ottenuti sono stati mediati e confrontati poi con il valore atteso, ovvero il valore di concentrazione, noto, della soluzione preparata e testata.

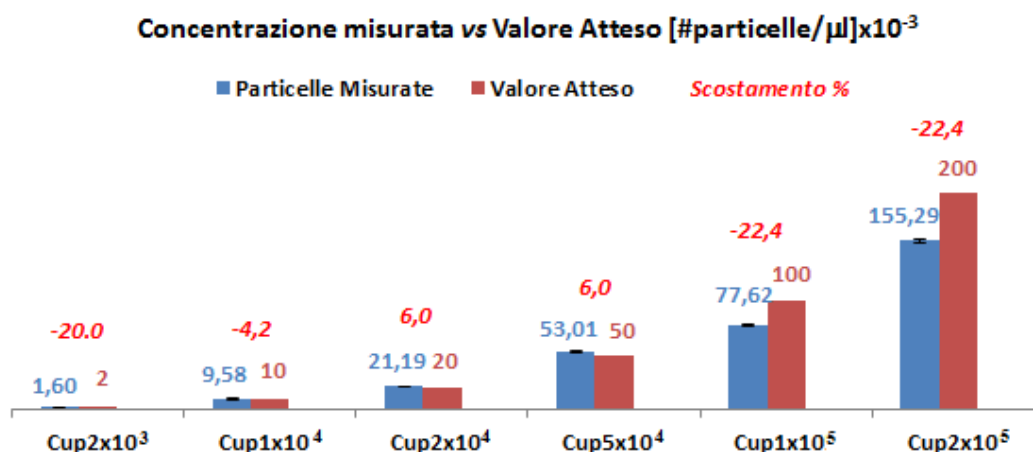
I risultati sono riportati nella Tabella 4.2:

Procedura di Calibrazione	Soluzione Analizzata	Valore Atteso [#particelle/ $\mu$ l]	Particelle Misurate [#particelle/ $\mu$ l]	Dev.St.	Scostamento [%]
Cal <sub>7gocce</sub>	Cup <sub>2x10<sup>3</sup></sub>	2.0x10 <sup>3</sup>	1.60x10 <sup>3</sup>	6.1x10 <sup>1</sup>	-20.0
	Cup <sub>1x10<sup>4</sup></sub>	1.0x10 <sup>4</sup>	9.58x10 <sup>3</sup>	3.1x10 <sup>2</sup>	-4.2
	Cup <sub>2x10<sup>4</sup></sub>	2.0x10 <sup>4</sup>	2.12x10 <sup>4</sup>	3.3x10 <sup>2</sup>	6.0
	Cup <sub>5x10<sup>4</sup></sub>	5.0x10 <sup>4</sup>	5.30x10 <sup>4</sup>	9.1x10 <sup>2</sup>	6.0
	Cup <sub>1x10<sup>5</sup></sub>	1.0x10 <sup>5</sup>	7.76x10 <sup>4</sup>	1.2x10 <sup>3</sup>	-22.4
	Cup <sub>2x10<sup>5</sup></sub>	2.0x10 <sup>5</sup>	1.55x10 <sup>4</sup>	1.6x10 <sup>3</sup>	-22.4

**Tabella 4.2:** Verifica della procedura di calibrazione del *Coluter Particle Counter* con la soluzione Cal<sub>7gocce</sub>.  
Lo scostamento (%) indica la differenza tra la concentrazione di particelle misurata dallo strumento rispetto al valore atteso.

I dati della Tabella 4.2 sono riportati nell'istogramma di Figura 4.2 per consentire un diretto confronto tra i risultati ottenuti:





**Figura 4.2:** Risultati della verifica della procedura di calibrazione del *Coulter Particle Counter* effettuata con la soluzione Cal<sub>7gocce</sub>. In figura, per ciascuna delle soluzioni testate, sono riportati i valori di scostamento % (in rosso) tra i dati forniti dallo strumento (particelle misurate) ed i valori attesi.

I risultati ottenuti indicano (Figura 4.2 e Tabella 4.2) come lo scostamento percentuale tra i valori misurati dallo strumento ed i valori attesi non sia affatto trascurabile per alcune delle soluzioni testate. In particolare, scostamenti molto elevati sono stati misurati nel caso delle soluzioni a più alta e più bassa concentrazione, ovvero le soluzioni Cup $1 \times 10^5$ , Cup $2 \times 10^5$  (scostamento pari a -22.4%) e Cup $2 \times 10^3$  (scostamento pari a -20%).

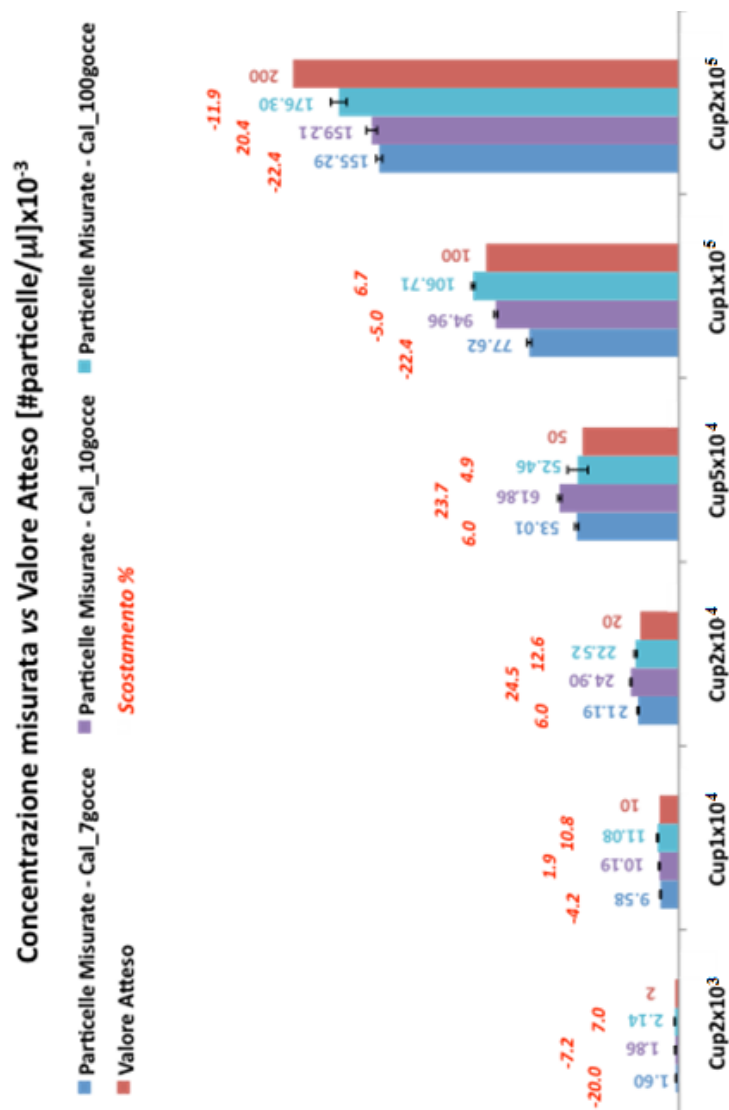
Si è pertanto deciso di ripetere la procedura di calibrazione nel tentativo di migliorare ulteriormente l'accuratezza delle letture fornite dallo strumento. A tale scopo sono state preparate due nuove soluzioni di calibrazione, inserendo rispettivamente 10 (Cal<sub>10gocce</sub> = 20particelle/ $\mu$ l) e 100 (Cal<sub>100gocce</sub> = 200particelle/ $\mu$ l) gocce della soluzione di Orgasol in 20 ml di soluzione fisiologica. In entrambi i casi, al termine della procedura di calibrazione, sono state poi nuovamente analizzate le 6 soluzioni a concentrazione nota utilizzate nella verifica della prima procedura di calibrazione. Sono state effettuate anche in questo caso 5 letture per ciascuna soluzione; i risultati sono stati successivamente mediati e confrontati, in termini di scarto percentuale, rispetto al numero di particelle attese.

I risultati, sono riportati nella Tabella 4.3:

Procedura di Calibrazione	Soluzione Analizzata	Valore Atteso [#particelle/ $\mu$ l]	Particelle Misurate [#particelle/ $\mu$ l]	Dev.St.	Scostamento [%]
<b>Cal<sub>10</sub>gocce</b>	Cup <sub>2x10</sub> <sup>3</sup>	2.0x10 <sup>3</sup>	1.86x10 <sup>2</sup>	1.4x10 <sup>1</sup>	-7.2
	Cup <sub>1x10</sub> <sup>4</sup>	1.0x10 <sup>4</sup>	1.02x10 <sup>4</sup>	2.5x10 <sup>1</sup>	1.9
	Cup <sub>2x10</sub> <sup>4</sup>	2.0x10 <sup>4</sup>	2.49x10 <sup>4</sup>	3.7x10 <sup>1</sup>	24.5
	Cup <sub>5x10</sub> <sup>4</sup>	5.0x10 <sup>4</sup>	6.19x10 <sup>4</sup>	9.3x10 <sup>1</sup>	23.7
	Cup <sub>1x10</sub> <sup>5</sup>	1.0x10 <sup>5</sup>	9.50x10 <sup>4</sup>	7.8x10 <sup>1</sup>	-5.0
	Cup <sub>2x10</sub> <sup>5</sup>	2.0x10 <sup>5</sup>	1.59x10 <sup>4</sup>	2.7x10 <sup>2</sup>	-20.4
<b>Cal<sub>100</sub>gocce</b>	Cup <sub>2x10</sub> <sup>3</sup>	2.0x10 <sup>3</sup>	2.14x10 <sup>3</sup>	1.1x10 <sup>1</sup>	7.0
	Cup <sub>1x10</sub> <sup>4</sup>	1.0x10 <sup>4</sup>	1.11x10 <sup>3</sup>	2.8x10 <sup>1</sup>	10.8
	Cup <sub>2x10</sub> <sup>4</sup>	2.0x10 <sup>4</sup>	2.25x10 <sup>4</sup>	6.3x10 <sup>1</sup>	12.6
	Cup <sub>5x10</sub> <sup>4</sup>	5.0x10 <sup>4</sup>	5.25x10 <sup>4</sup>	5.3x10 <sup>1</sup>	4.9
	Cup <sub>1x10</sub> <sup>5</sup>	1.0x10 <sup>5</sup>	1.07x10 <sup>5</sup>	8.5x10 <sup>1</sup>	6.7
	Cup <sub>2x10</sub> <sup>5</sup>	2.0x10 <sup>5</sup>	1.76x10 <sup>4</sup>	4.1x10 <sup>2</sup>	-11.9

**Tabella 4.3:** : Verifica della procedura di calibrazione del *Coulter Particle Counter* con le soluzioni Cal<sub>10</sub>gocce e Cal<sub>20</sub>gocce. Lo scostamento (%) indica la differenza tra la concentrazione di particelle misurata dallo strumento rispetto al valore atteso.

I dati presentati in Tabella 4.2 (calibrazione con Cal<sub>7</sub>gocce) e Tabella 4.3 (calibrazione con Cal<sub>10</sub>gocce e Cal<sub>100</sub>gocce) sono riassunti nell'istogramma di Figura 4.3 per consentire un diretto confronto tra i risultati ottenuti.

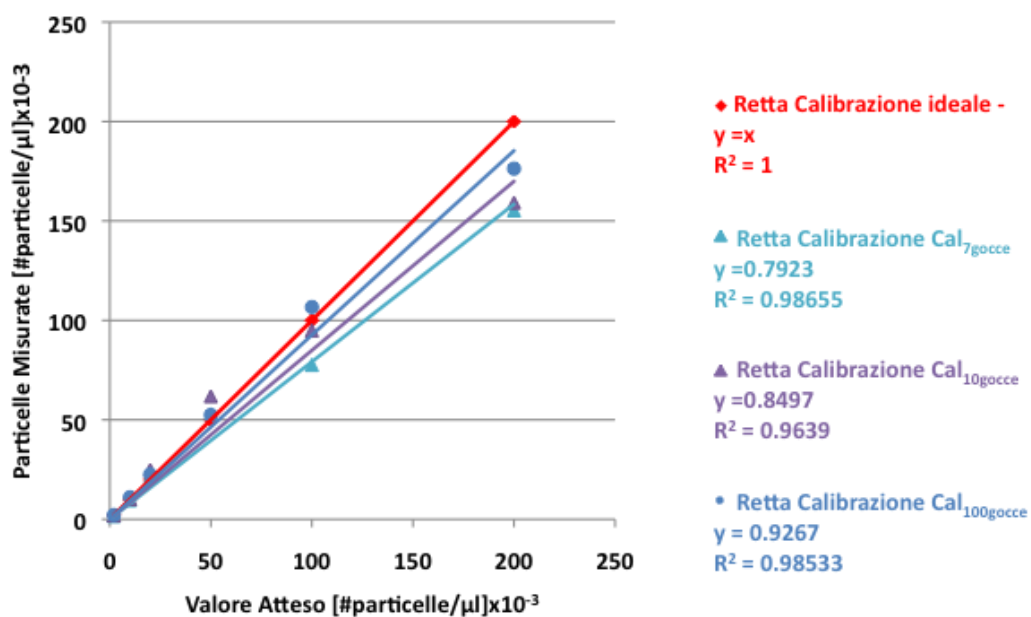


**Figura 4.3:** Risultati della verifica della procedura di calibrazione del *Coluter Particle Counter* effettuata con le soluzioni Cal<sub>7gocce</sub>, Cal<sub>10gocce</sub> e Cal<sub>100gocce</sub>. Per ciascuna delle soluzioni testate, sono riportati i valori di scostamento % (in rosso) tra i dati forniti dallo strumento (particelle misurate) ed i valori attesi.

Confrontando i dati ottenuti con le tre differenti soluzioni di calibrazione, si può osservare come nessuna di queste abbia portato ad avere un netto miglioramento dell'accuratezza (minore scostamento percentuale tra dato misurato e valore atteso) delle letture in tutto il *range* di concentrazioni testate. Rispetto alla calibrazione effettuata con la soluzione Cal<sub>7gocce</sub>, l'accuratezza ottenuta con le soluzioni Cal<sub>10gocce</sub> e Cal<sub>100gocce</sub> migliora ad esempio considerando la soluzione test a più bassa concentrazione (Cup<sub>2x10<sup>3</sup></sub>) o la soluzione Cup<sub>1x10<sup>5</sup></sub>, ma peggiora notevolmente considerando invece la Cup<sub>2x10<sup>4</sup></sub>. In definitiva,

l'analisi effettuata non consente di determinare in maniera diretta quale sia la soluzione di calibrazione ottimale per effettuare la calibrazione dello strumento.

Sono state successivamente ricavate le rette di calibrazione per ciascuna procedura di calibrazione effettuata, ottenute interpolando i dati sperimentali con una retta di regressione lineare, forzando l'intercetta a zero. Per ciascuna retta è stata ricavata la propria equazione e calcolati i coefficienti  $R^2$  ad esse associati (Figura 4.4) che sono stati confrontati poi rispetto al valore di  $R^2$  della retta di calibrazione "ideale", ossia la retta  $y = x$ , con  $R^2 = 1$ .



**Figura 4.4:** Rette di calibrazione per ciascuna delle procedure di calibrazione testate sul *Coulter Particle Counter*. A destra della figura sono riportate le equazioni delle rette di calibrazione e i relativi valori di  $R^2$ , confrontati rispetto alla retta di calibrazione ideale (rossa).

Al termine delle campagne sperimentali svolte, nella scelta della soluzione da utilizzare per la calibrazione del *Coulter Particle Counter* sono stati presi in considerazione diversi fattori:

- i) la misura della concentrazione più rilevante ai fini dell'esecuzione del PAS *assay* è quella che riguarda la soluzione EXP: è fondamentale, infatti, che la concentrazione del campione sia il più prossima possibile a  $20 \times 10^3$  piastrine/ $\mu\text{l}$ . L'importanza di una precisa misurazione della concentrazione dell'EXP è legata alla determinazione

delle quantità di reagenti che dovranno essere utilizzati per l'esecuzione del test, quali i reagenti che compongono le soluzioni *Tube* e *Well* (la cui composizione è descritta nel paragrafo 3.1.6. Errori nella misura della concentrazione dell'EXP causerebbero quindi un non corretto dosaggio dei reagenti inficiando il buon esito dell'*assay* in termini di sovra/sottostima della quantificazione del livello di attivazione piastrinica.

- ii) Analizzando le rette di regressione lineare, si può determinare, per confronto rispetto alla retta ideale, quale sia la concentrazione ottimale della soluzione da utilizzare per la calibrazione, facendo riferimento al valore di  $R^2$ . Più il valore dell' $R^2$  delle rette di calibrazione è prossimo a 1, maggiore sarà il grado di accuratezza delle misure fornite dallo strumento.

Analizzando quindi i grafici di Figura 4.3 e 4.4 si può notare come:

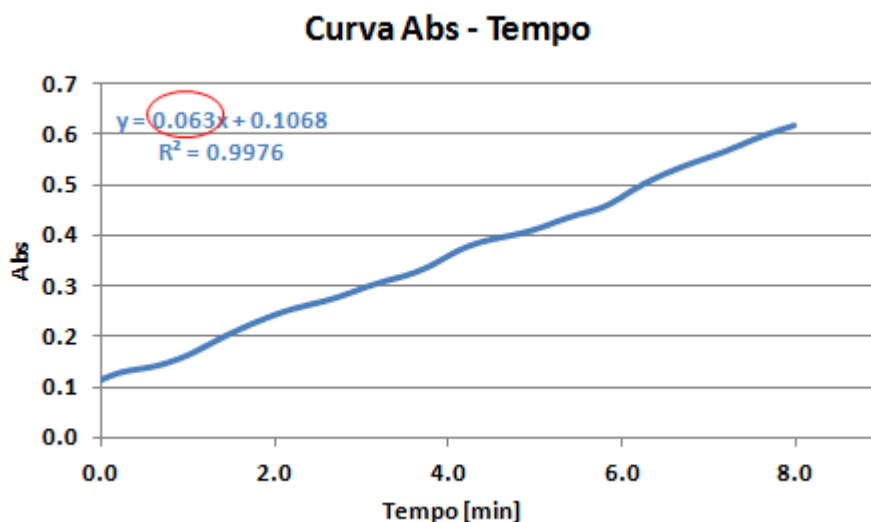
- i) La calibrazione che, nell'intorno del valore di nostro interesse (concentrazione dell'EXP =  $20 \times 10^3$  piastrine/ $\mu$ l), presenta uno scostamento percentuale minore rispetto al valore atteso, e che quindi consente di avere risultati più accurati è la Cal<sub>7gocce</sub>, che determina uno scostamento pari al 6.0% ( $C_{p2 \times 10^4}$ ), rispetto ai valori di 24.5% e 12.6% riscontrati, rispettivamente con le soluzioni Cal<sub>10gocce</sub> e Cal<sub>100gocce</sub>.
- ii) Confrontando i valori  $R^2$  delle rette di regressione, quello più vicino al valore 1 ( $R^2$  della retta "ideale") è quello della retta Cal<sub>7gocce</sub>.

La scelta definitiva della soluzione da utilizzare per la calibrazione dello strumento è ricaduta perciò sulla soluzione Cal<sub>7gocce</sub>. Eseguendo nuovamente la calibrazione utilizzando tale soluzione si è giunti a determinare il valore della costante  $K_d$  che risulta essere pari a 74.52.

### 4.3 Definizione del protocollo di sonicazione dei campioni

La procedura di sonicazione cui sono sottoposti i campioni consente di ottenere la massima attivazione piastrinica. Il valore di attivazione ottenuto sul campione sonicato è poi utilizzato per normalizzare il livello espresso da campioni piastrinici stimolati in HSD (o altri strumenti).

La quantificazione dell'attivazione piastrinica dei campioni stimolati è misurata attraverso la lettura spettrofotometrica del campione. Tale analisi rileva la dinamica della variazione del valore di assorbanza (Abs) del campione durante un intervallo di tempo prestabilito. La curva (che ha andamento lineare) è costruita interpolando i valori di Abs misurati e la sua pendenza (coefficiente angolare, Abs\_slope) è un indice correlato con la quantità di trombina prodotta dal campione, ossia con il suo livello di attivazione. In Figura 4.5 è riportato un esempio di curva che descrive la variazione di Abs nel tempo di un campione piastrinico durante la lettura spettrofotometrica.



**Figura 4.5:** Variazione di Abs nel tempo di un campione piastrinico rilevata durante la lettura spettrofotometrica. È riportata l'equazione della retta interpolante: il valore cerchiato in rosso rappresenta la pendenza di tale retta (Abs\_slope).

Come descritto nel capitolo precedente (Capitolo 3, paragrafo 3.1.5.1), la definizione del protocollo di sonicazione ha previsto l'esecuzione di due fasi sperimentali distinte, attraverso cui determinare:

3. Fase I: valore del livello di potenza ottimale della sonicazione;
4. Fase II: intervallo di tempo ottimale di applicazione dello stimolo.

I criteri utilizzati per la definizione dei due valori sopra riportati sono stati: i) ottenimento, a parità di campione piastrinico, del più alto livello di attivazione; ii) preservazione dell'integrità e della vitalità delle piastrine stimulate al termine della sonicazione.

### 4.3.1 Fase I: Identificazione del valore di potenza ottimale

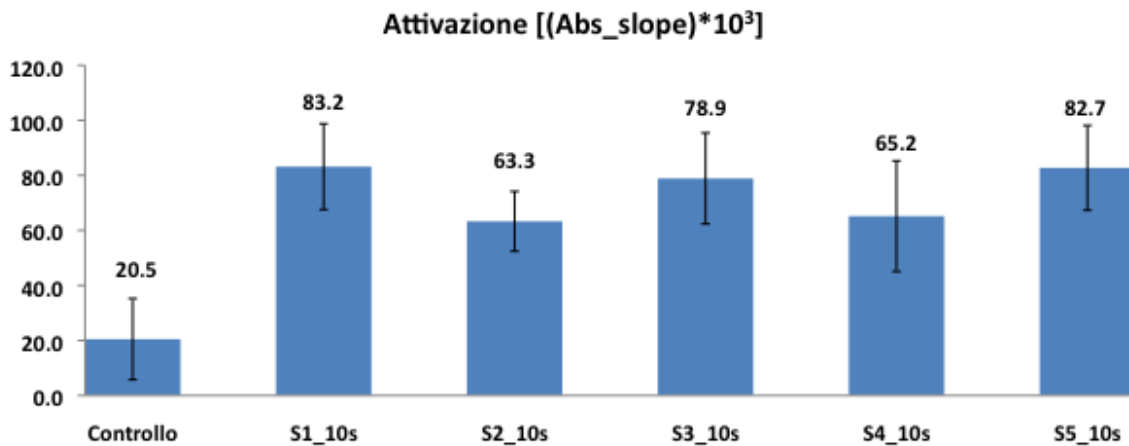
Il protocollo di sonicazione originale fornitoci dai ricercatori dell'Università di Stony Brook prevedeva una stimolazione di durata pari a 10 sec. In questa prima fase, si è perciò valutato quale fosse il livello di attivazione dei campioni piastrinici sottoposti a sonicazione di durata fissata pari a 10 sec al variare della potenza dello stimolo (Tabella 3.4). E' stato inoltre effettuato il PAS *assay* su campioni piastrinici non sottoposti a sonicazione, utilizzati come campioni di controllo rispetto ai quali valutare i risultati ottenuti dalle sonicazioni effettuate.

I risultati di attivazione piastrinica ottenuti, espressi in termini del valore di Abs\_slope, sono riportati in Tabella 4.4.

<b>Protocollo di Sonicazione</b>	<b># Campioni</b>	<b>(Abs_slope)x10<sup>3</sup></b>
<b>Controlli (non sonicati)</b>	18	20.5 ± 14.7
<b>S1<sub>10s</sub></b>	15	83.2 ± 15.6
<b>S2<sub>10s</sub></b>	15	63.3 ± 10.9
<b>S3<sub>10s</sub></b>	8	78.9 ± 16.5
<b>S4<sub>10s</sub></b>	8	65.2 ± 20.1
<b>S5<sub>10s</sub></b>	16	82.7 ± 15.4

**Tabella 4.4:** Valori di attivazione piastrinica (media±deviazione standard) ottenuti a parità di durata dello stimolo (10 sec) ed al variare della potenza della sonicazione dei campioni piastrinici. I valori di Abs\_slope sono stati moltiplicati per il fattore moltiplicativo  $1 \times 10^3$  per una più chiara interpretazione dei dati.

I risultati sono riassunti nel grafico di Figura 4.6.



**Figura 4.6:** Valori di attivazione piastrinica (Abs\_slope) dei campioni piastrinici sottoposti a procedure di sonicazione caratterizzate da stessa durata dello stimolo (10 sec) ma differente livello di potenza.

Come si può notare dal grafico di Figura 4.6, la sonicazione ha effettivamente attivato le piastrine presenti in ciascun campione: infatti i controlli sono caratterizzati da un valore di Abs\_slope decisamente inferiore rispetto al valore dei campioni sonicati. Tale risultato è di primaria importanza in considerazione del progetto di tesi svolto, dimostrando cioè che tutte le procedure sperimentali sono state definite ed eseguite in maniera corretta.

Tornando all'analisi del grafico di Figura 4.6, si osserva poi che i campioni sonicati mostrano valori di Abs\_slope sostanzialmente confrontabili tra loro. Inoltre i valori di Abs\_slope non mostrano un trend crescente al crescere della potenza di sonicazione. Ciononostante, i valori maggiori sono stati ottenuti tramite i protocolli S1\_10s ( $83.2 \pm 15.6$ ) e S5\_10s ( $82.7 \pm 15.4$ ) e pertanto si è proceduto a misurare la concentrazione piastrinica dei campioni sottoposti a queste procedure di sonicazione. L'obiettivo in questo caso è stato quello di assicurarsi che la stimolazione applicata non avesse danneggiato le piastrine comportandone la rottura.

L'indice utilizzato nella valutazione dell'eventuale rottura delle piastrine è stato il modulo dello scarto percentuale ( $\Delta$ Concentrazione, eq. 4.1) tra la concentrazione del campione a seguito della procedura di sonicazione ( $Concentrazione_{POST\ SONICAZIONE}$ ) e la concentrazione del campione pre-sonicazione ( $Concentrazione_{EXP}$ ):

$$\Delta Concentrazione = \left| \frac{(Concentrazione_{POST\ SONICAZIONE} - Concentrazione_{EXP})}{Concentrazione_{EXP}} \times 100 \right| \quad (4.1)$$



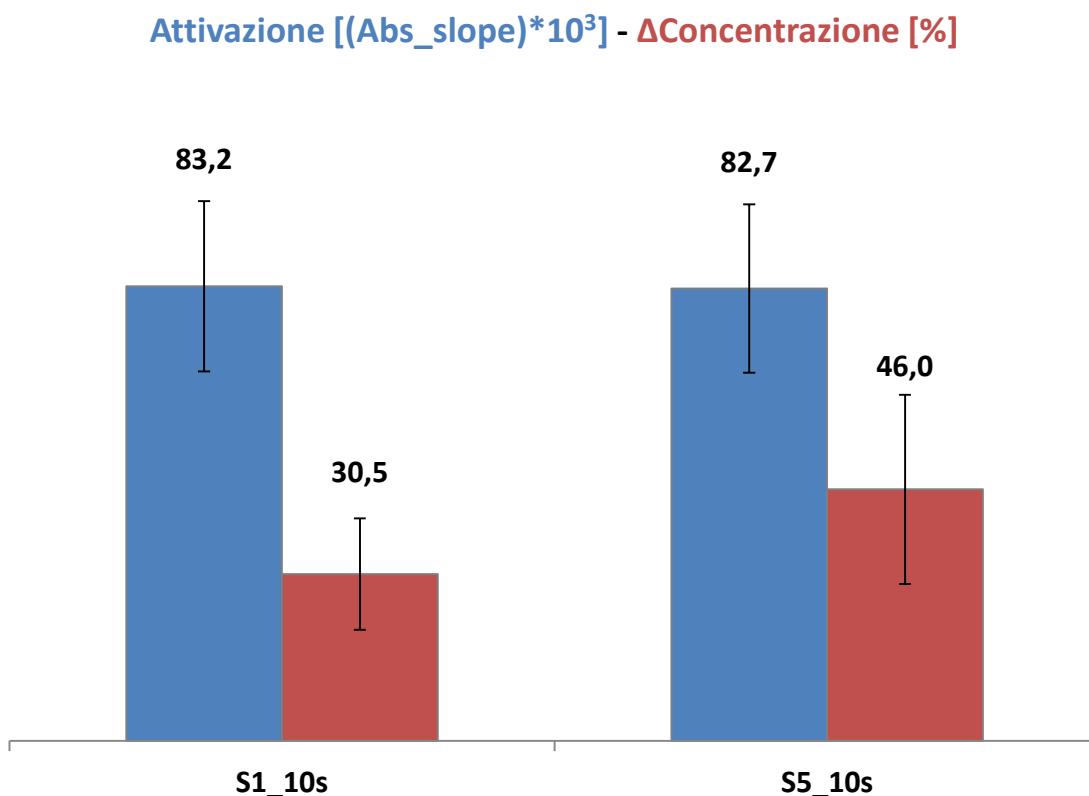
in questo modo  $\Delta$ Concentrazione rappresenta la percentuale di piastrine danneggiate, le quali, infatti, non vengono rilevate dal *Coulter Particle Counter* dal momento che il diametro dei detriti cellulari è inferiore alla soglia minima del range di misura settato per lo strumento (2.3-4  $\mu$ m, diametro medio delle piastrine).

I risultati relativi al confronto tra i protocolli S1\_10s ed S5\_10s sono riportati in Tabella 4.5.

Protocollo di Sonicazione	Attivazione [(Abs_slope)*10 <sup>3</sup> ]	$\Delta$ Concentrazione [%]
S1_10s	83.2 $\pm$ 15.6	30.5 $\pm$ 10.2
S5_10s	82.7 $\pm$ 15.4	46.0 $\pm$ 17.3

**Tabella 4.5:** Valori di Abs\_slope e  $\Delta$ Concentrazione misurati nei campioni sottoposti ai protocolli di sonicazione S1<sub>10s</sub> e S5<sub>10s</sub>.

Per effettuare più facilmente il confronto tra i due protocolli i dati presenti in tabella sono stati riportati nel grafico di Figura 4.7.



**Figura 4.7:** Valori di Abs\_slope e  $\Delta$ Concentrazione misurati nei campioni sottoposti ai protocolli di sonicazione S1\_10s e S5\_10s.

È possibile osservare dal grafico come, a parità di attivazione piastrinica, il protocollo S5\_10s causa la rottura di circa il 46% delle piastrine presenti nel campione contro il 30% osservato per il protocollo S1\_10s, che perciò risulta essere preferibile al primo. Nonostante il valore di piastrine danneggiate con il protocollo S1\_10s non sia poi così basso non è possibile ridurre ulteriormente la potenza della sonicazione, in quanto lo strumento consente di applicare un livello minimo di stimolo pari al 10% della sua potenza massima (70W), quindi pari appunto a 7W, il valore di potenza del protocollo S1.

Il valore di attivazione paragonabile tra i due protocolli, nonostante il numero di piastrine sia differente, è spiegabile ipotizzando una sorta di iper-espressione non fisiologica di trombina da parte delle piastrine rimaste integre nel campione stimolato con il protocollo S5. Tale effetto è difficilmente o non del tutto controllabile durante l'esperimento, e pertanto assolutamente da evitare al fine di avere risultati ripetibili al variare dei campioni di sangue.

Il livello di sonicazione S1, pari al 10% della potenza massima del sonicatore, risulta quindi sufficiente ad indurre nelle piastrine il loro massimo livello di attivazione e allo stesso tempo causa la perdita di una percentuale inferiore di piastrine presenti nel campione: la scelta del livello di potenza ottimizzata da utilizzare negli esperimenti di PAS *assay* è ricaduta dunque sul valore S1 (7 W).

#### **4.3.2 Fase II: individuazione della durata di applicazione dello stimolo**

Fissato il livello di potenza di sonicazione a 7 W (protocollo S1), si è deciso di testare tempi differenti di applicazione dello stimolo per valutare se e come il livello di attivazione del campione possa dipendere dalla durata della sollecitazione. Sono stati quindi testati diversi protocolli caratterizzati dallo stesso livello di potenza (S1) ma da tempi di durata dello stimolo differenti (da 3 a 30 secondi, Tabella 3.5).

In questa seconda fase di analisi si è deciso di valutare lo scarto percentuale della concentrazione ( $\Delta$ Concentrazione) per tutti i campioni testati rispetto alla concentrazione iniziale (campione non sottoposto a sonicazione). In questo modo è stato possibile effettuare un confronto tra il livello di attivazione e la perdita percentuale delle piastrine

del campione provocata da tempi differenti di applicazione dello stimolo. Anche in questo caso, è stato effettuato il PAS *assay* su campioni piastrinici non stimolati (Controllo). Inoltre, per effettuare una verifica della scelta del valore di potenza (S1) del sonicatore, si è deciso di testare anche il protocollo S2\_10s, con l'obiettivo di confermare i risultati ottenuti nella prima fase, descritta nel paragrafo 4.3.1.

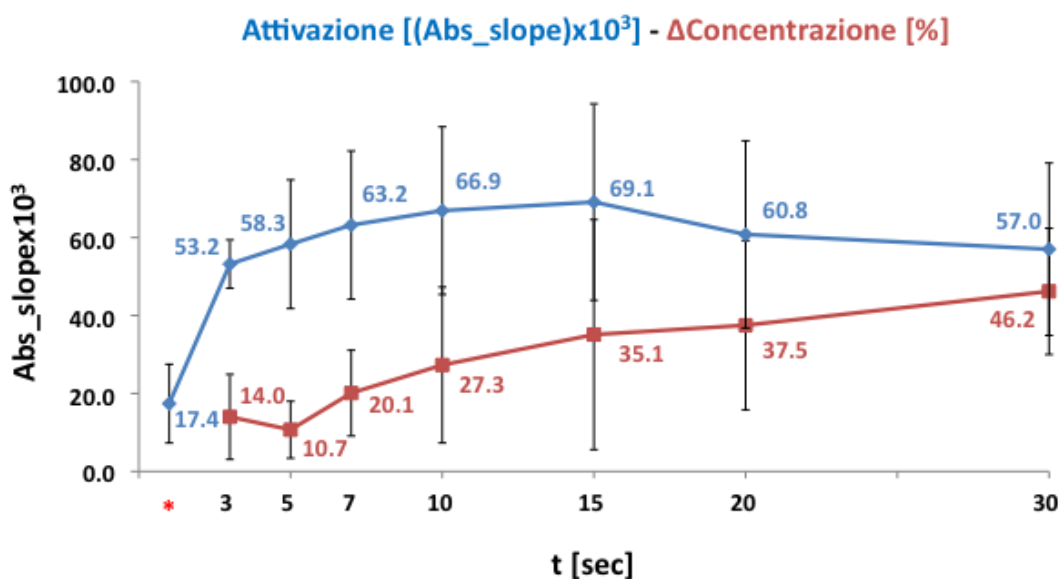
I risultati di attivazione piastrinica ottenuti, in termini di Abs\_slope e ΔConcentrazione sono riportati in Tabella 4.6.

Protocollo di Sonicazione	# Campioni	Attivazione [(Abs_slope)*10 <sup>3</sup> ]	Δ Concentrazione [%]
Controlli	20	17.4 ± 10.1	**
S1_3s	6	53.2 ± 6.2	14.0 ± 10.9
S1_5s	8	58.3 ± 16.5	10.7 ± 9.3
S1_7s	20	63.2 ± 19.0	20.1 ± 11.0
S1_10s	35	66.9 ± 21.5	27.3 ± 20.0
S1_15s	14	69.1 ± 25.2	35.1 ± 29.5
S1_20s	8	60.8 ± 24.0	37.5 ± 21.7
S1_30s	8	57.0 ± 22.1	46.2 ± 16.2
S2_10s	25	57.4 ± 19.6	18.3 ± 8.2

**Tabella 4.6:** Valori Abs\_slope e ΔConcentrazione misurati nei campioni sottoposti a protocolli di sonicazione di durata variabile, a parità di potenza dello stimolo (S1). In tabella sono riportati anche i valori di Abs\_slope e ΔConcentrazione dei campioni piastrinici di controllo (non sonicati) e dei campioni sottoposti al protocollo di sonicazione S2\_10s.

L'analisi dei risultati presentati in Tabella 4.6 ha confermato la scelta del valore di potenza di sonicazione; anche in questa seconda fase infatti l'attivazione delle piastrine stimolate attraverso il protocollo S2\_10s è risultata inferiore rispetto all'attivazione misurata sui campioni sottoposti al protocollo di sonicazione S1\_10s.

Per effettuare più facilmente il confronto tra i protocolli con potenza S1, i dati presenti in Tabella 4.6 sono stati riportati nel grafico di Figura 4.8.



**Figura 4.8:** Valori di Abs\_slope e ΔConcentrazione % misurati nei campioni sottoposti a protocolli di sonicazione di durata variabile, a parità di potenza dello stimolo (S1 = 7W);

\* indica il campione di controllo (non sonicato).

Anche in questo caso la sonicazione ha effettivamente attivato le piastrine presenti in ciascun campione ed anche in questo caso i controlli sono caratterizzati da un valore di Abs\_slope molto più basso rispetto al valore misurato per i campioni sonicati. Inoltre, si può notare come i controlli (\*) siano caratterizzati da un valore di ΔConcentrazione nullo poiché le piastrine non subiscono alcuna sollecitazione ed il valore di concentrazione dei campioni sottoposti al PAS assay è lo stesso della soluzione EXP di partenza.

Come mostrato in figura, il valore di Abs\_slope cresce con il crescere della durata dello stimolo, fino ad un valore di tempo di applicazione dello stimolo pari a 15 sec. Oltre i 15 sec l'attivazione piastrinica inizia a diminuire, indice di un progressivo danneggiamento delle piastrine sonicate, come confermato dai valori di ΔConcentrazione per i quali si osserva un trend di incremento continuo all'aumentare del tempo di esposizione dello stimolo.

Questa seconda fase sperimentale ha consentito perciò di definire come la durata di applicazione ottimizzata dello stimolo sia pari a 10 sec, valore che consente di ottenere un elevato valore di attivazione senza danneggiare eccessivamente le piastrine sonicate.

In conclusione, alla luce dei risultati ottenuti, la scelta del protocollo definitivo di sonicazione ricade sul protocollo S1\_10s (7W per 10 sec). Tale protocollo, inoltre, consente di ottenere dati di attivazione paragonabili ai valori ottenuti presso l'Università di Stony Brook (10 W per 10 sec su piastrine di origine umana).

#### **4.4. Acetilazione della protrombina**

L'acetilazione della protrombina (FII) è un passaggio fondamentale del PAS *assay* perché permette di ottenere una valutazione diretta ed univoca del legame tra gli sforzi meccanici subiti dalle piastrine e il loro livello di attivazione, eliminando il meccanismo di feedback positivo indotto dalla trombina fisiologica sul livello di attivazione delle piastrine.

Il processo di acetilazione è svolto in tre diverse fasi al termine delle quali è analizzata, attraverso uno spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 280 nm, l'assorbanza ( $A_{280}$ ) del campione FII acetilato (Ac-FII) (ovvero il campione acetilato, paragrafo 3.1.7). Dal valore di  $Abs_{280}$  si calcola poi la concentrazione molare (C) dell'Ac-FII (eq. 3.1, paragrafo 3.1.7) e si verifica che il suo valore sia prossimo a 10  $\mu$ M (C dell'Ac-FII).

L'analisi spettrofotometrica è stata svolta presso i laboratori del Dipartimento di Chimica del Politecnico di Milano; sono stati analizzati 9 campioni di Ac-FII, prelevati dai tubi utilizzati durante il processo di dialisi.

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4.7.

<b>Campione</b>	<b>net A<sub>280</sub></b>
Campione 1	0.75
Campione 2	0.77
Campione 3	0.78
Campione 4	0.78
Campione 5	0.79
Campione 6	0.79
Campione 7	0.77
Campione 8	0.76
Campione 9	0.76

**Tabella 4.7:** Valori di A<sub>280</sub> dei campioni di Ac-FII.

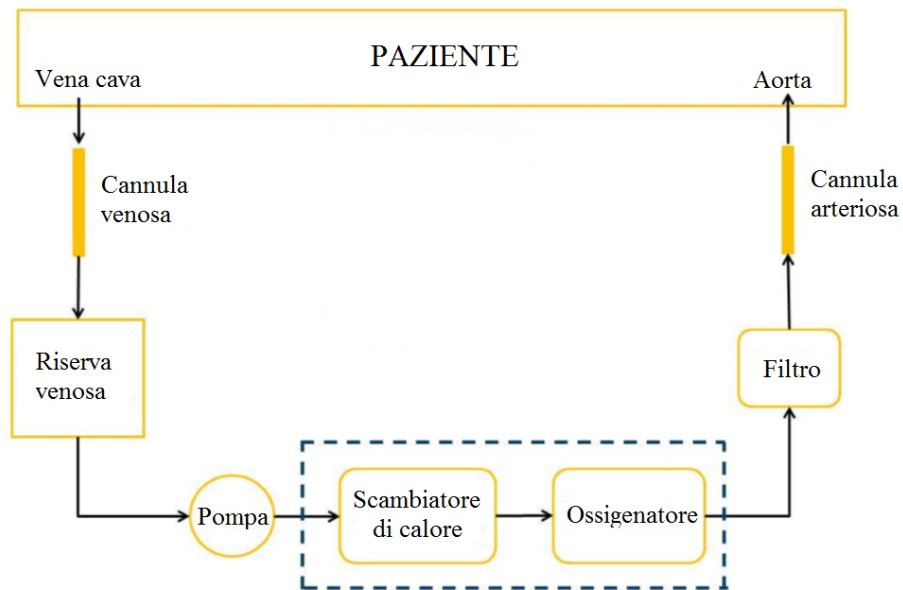
La media di questi 9 valori è stata utilizzata poi per il calcolo del valore di C dell' Ac-FII (eq. 4.1): il valore ottenuto risulta pari a  $7.77 \pm 0.01 \mu\text{M}$ , risultato che conferma quindi l'avvenuta acetilazione del FII. Tale risultato garantisce la consistenza dei dati nell'ambito del presente lavoro di tesi.

## Capitolo 5

### **Applicazione del PAS *assay*: studio della trombogenicità di due differenti modelli di ossigenatori neonatali**

L'impianto delle protesi e dei dispositivi di assistenza, quali ad esempio i VAD, così come gli interventi di trapianto di cuore e/o il by-pass aorto-coronarico, richiedono che la funzione cardiopolmonare del paziente sia momentaneamente interrotta e sostituita, in regime di circolazione extracorporea (CEC), da un complesso di macchine artificiali, noto come macchina cuore-polmone.

Come descritto nel Capitolo 1, la CEC prevede l'esecuzione del by-pass cardiopolmonare: il sangue venoso del paziente è prelevato mediante una cannula inserita nella vena cava e spinto per gravità in una riserva venosa. Da qui, attraverso una pompa artificiale, è spinto da prima all'interno di uno scambiatore di calore che regola la temperatura del sangue ed in seguito in un ossigenatore in grado di supplire la funzione dei polmoni, ossia consentire lo scambio di ossigeno ( $O_2$ ) ed anidride carbonica ( $CO_2$ ). Nei moderni sistemi, questi ultimi due componenti risultano essere integrati in unico dispositivo. Infine, il sangue, dopo essere passato all'interno di un filtro, è re-immesso nel circolo sistemico del paziente attraverso un'ulteriore cannula inserita nell'aorta (Figura 5.1).



**Figura 5.1:** rappresentazione schematica del circuito della CEC.

Uno dei principali componenti della CEC, ed elemento oggetto di analisi del presente lavoro, è l'ossigenatore, dispositivo la cui funzione è garantire una corretta ossigenazione del sangue venoso, così da consentire il nutrimento dei tessuti periferici durante la momentanea interruzione della funzione polmonare.

Le complicazioni associate all'utilizzo degli ossigenatori sono molteplici: in particolare, il regime di flusso e gli elevati sforzi di taglio possono causare la rottura dei globuli rossi (emolisi) e l'attivazione (meccanica) delle piastrine. Inoltre, il contatto delle piastrine con le superfici artificiali che costituiscono il dispositivo può determinare attivazione (per contatto) e aggregazione piastrinica con conseguente formazione di trombi [9]. Attualmente, uno dei principali obiettivi perseguiti nella progettazione dei moderni ossigenatori è quello di limitare l'insorgere di tali complicazioni (emolisi e formazione di trombi), in modo da non causare elevati stress meccanici alle cellule del sangue e riducendo l'area delle superfici artificiali a contatto con il tessuto ematico [11].

Nel presente capitolo sono riportati i risultati di uno studio pilota condotto nell'ambito del presente lavoro che consiste nell'applicazione del PAS *assay* per la valutazione del rischio trombogenico associato ad un modello di ossigenatore neonatale, il Kids D100,



ossigenatore a fibre cave prodotto dalla SGI. Nello specifico, lo studio pilota ha previsto due soli esperimenti. I due test effettuati hanno avuto l'obiettivo di confrontare il livello di attivazione piastrinica indotto dall'utilizzo di:

- iii) ossigenatori costituiti da fibre polimeriche “nude” - ossia prive di trattamento superficiale anti-trombogenico
- iv) ossigenatori dotati di fibre polimeriche rivestite con fosforilcolina, al fine di verificare l'effettivo potenziale di questa molecola nel ridurre i fenomeni di adesione piastrinica e il conseguente rischio di formazione di trombi.

### **5.1 Ossigenatore neonatale Kids D100**

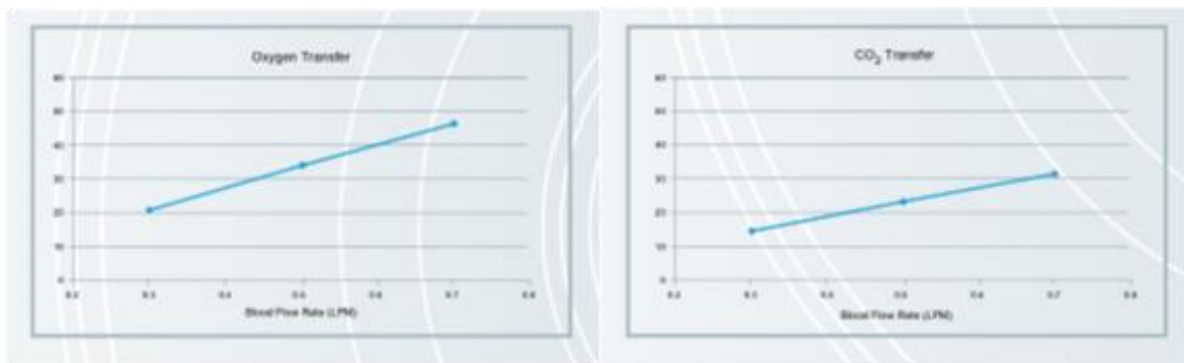
L'ossigenatore neonatale Kids D100 (Figura 5.2) è un ossigenatore costituito da fasci di fibre cave polimeriche con integrato uno scambiatore di calore metallico. Dopo aver attraversato lo scambiatore di calore, il sangue passa nel modulo dell'ossigenatore: all'interno delle fibre scorre il gas ( $O_2$ ), mentre il sangue si muove all'esterno di esse. Il dispositivo ha dimensioni molto ridotte e presenta un volume di riempimento (*priming*) pari a 31 ml, che consente di minimizzare l'emodiluizione dei pazienti durante l'intervento e l'area delle superfici artificiali a contatto con il sangue.

L'ossigenatore è dotato inoltre di una riserva venosa e di un filtro arterioso: tali componenti sono però stati esclusi dall'analisi svolta nel presente studio, il cui obiettivo è quello di valutare la trombogenicità associata al modulo dell'ossigenatore, in funzione di due differenti modelli di fibra (nuda e rivestita).



**Figura 5.2:** Ossigenatore Kids D100, prodotto dalla SGI. In figura sono mostrati: la riserva venosa (1), l'ossigenatore (2), lo scambiatore di calore (3) ed il filtro arterioso (4) [54].

Il fascio di fibre del modulo dell'ossigenatore ha una superficie totale di  $0.22 \text{ m}^2$  a cui si aggiunge la superficie dello scambiatore, anch'essa molto ridotta, pari a  $0.03 \text{ m}^2$  [54]. Nell'ossigenatore gli scambi di gas avvengono attraverso la membrana microporosa del fascio di fibre, permettendo così al sangue venoso di caricarsi di  $\text{O}_2$  e cedere, allo stesso tempo la  $\text{CO}_2$ . Alla portata nominale di  $500 \text{ ml/min}$  di sangue, in regime di CEC, il dispositivo trasferisce  $34 \text{ ml/min}$  di  $\text{O}_2$  e  $23 \text{ ml/min}$  di  $\text{CO}_2$  [54]. In Figura 5.3 sono riportate le curve caratteristiche delle prestazioni del dispositivo, dichiarate del costruttore [54].

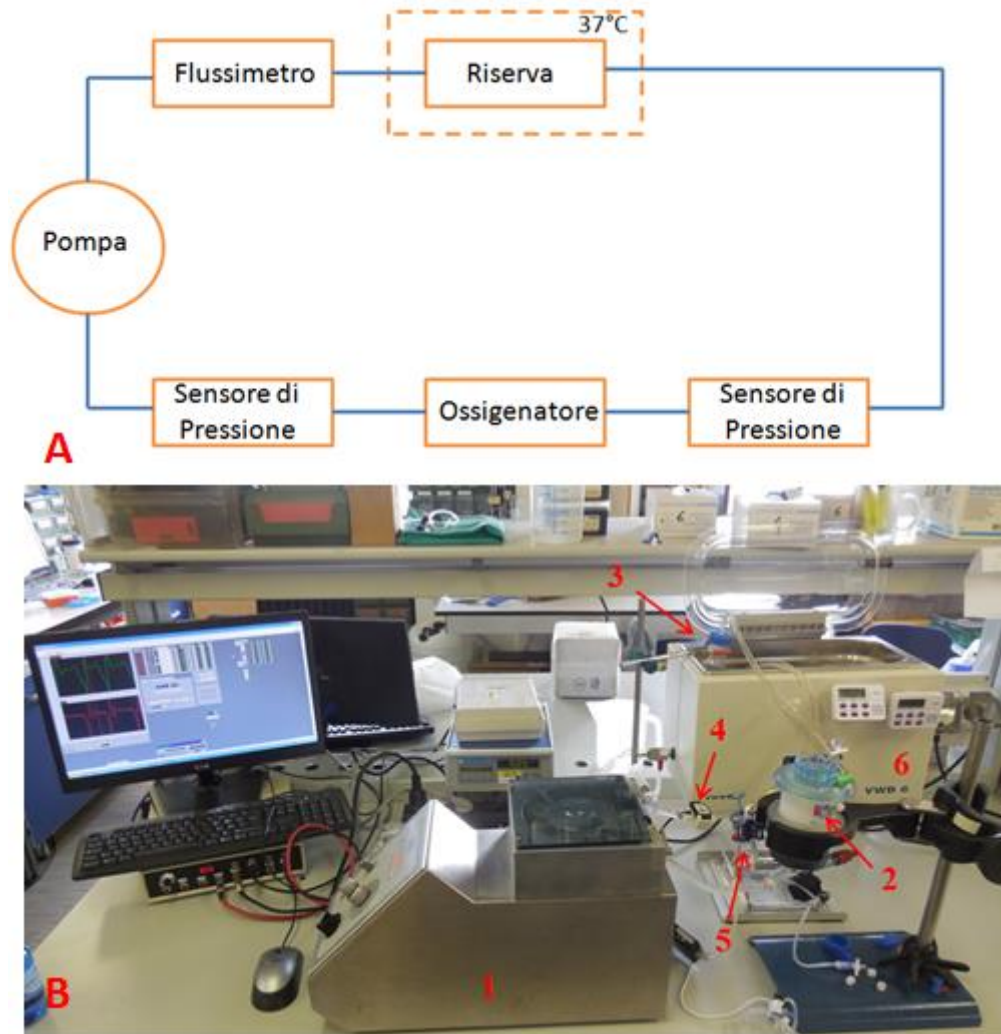


**Figura 5.3:** Portate di scambio di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> al variare della portata del sangue che fluisce all'interno dell'ossigenatore [54].

Al fine di migliorare la biocompatibilità del dispositivo, le fibre del Kids D100 sono rivestite con fosforilcolina, molecola in grado di inibire l'adesione delle piastrine sulla superficie delle fibre: la fosforilcolina presenta infatti gruppi polari che formano una struttura simile a quella dei fosfolipidi di membrana generando così uno strato biomimetico sulla superficie delle fibre.

## 5.2 Descrizione del set-up sperimentale

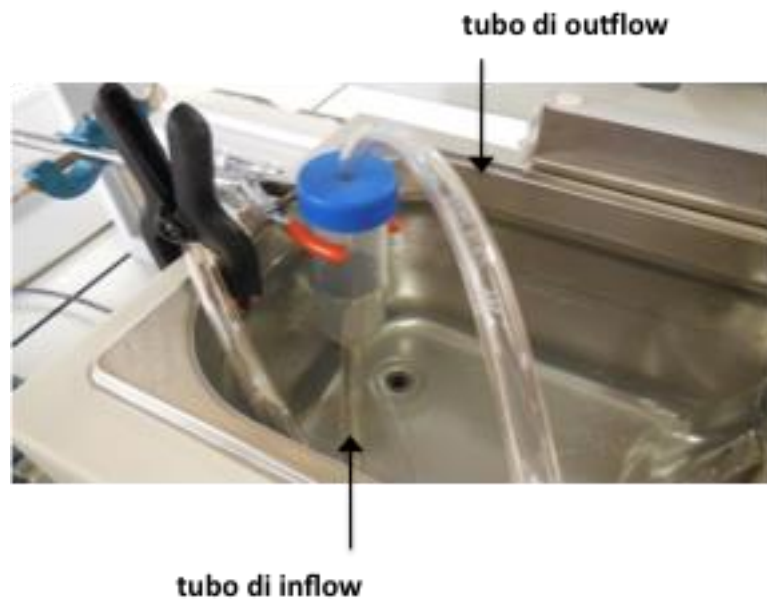
Il set-up sperimentale utilizzato per i due esperimenti condotti per lo studio della trombogenicità del Kids D 100 riproduce il circuito della CEC in cui è inserito l'ossigenatore ed è costituito da (Figura 5.4):



**Figura 5.4** Rappresentazione schematica del circuito (A) e set-up sperimentale (B) utilizzato per l'analisi del rischio trombotico associato agli ossigenatori neonatali Kids D 100; 1: Pompa Roller, 2: Ossigenatore, 3. Riserva, 4: Flussimetro, 5. Sensore di pressione, 6. Bagno termostatico.

- i) Bagno termostatico (**VWR, VWB 6**), utilizzato per mantenere la temperatura del campione piastrinico che circola all'interno del circuito alla temperatura fisiologica di 37°C;
- ii) Riserva contenente il campione piastrinico: all'interno del bagno termostatico è immersa una riserva contenente il campione piastrinico. Tale riserva è costituita da una Falcon da 50 ml opportunamente modificata (Figura 5.5): i) l'estremità inferiore della Falcon è stata forata ed è stato montato (per incollaggio) un connettore portagomma in grado di alloggiare tubi con diametro da 3/16 di

pollice; il foro inferiore della Falcon rappresenta l'inflow del circuito: da qui la pompa preleva i campioni piastrinici e li spinge ad attraversare l'ossigenatore; tale modifica è stata realizzata con lo scopo di ridurre la sollecitazione che si sarebbe imposta alle piastrine prelevando dall'alto (per aspirazione) il campione piastrinico attraverso un tubo inserito nella Falcon; ii) il tappo della Falcon è stato forato in modo tale da consentire il passaggio di un tubo, anch'esso con diametro di 3/16 di pollice; il tubo inserito nel tappo della Falcon rappresenta la sezione di outflow del circuito, consentendo di riversare nella riserva il campione piastrinico al termine di ciascun passaggio nel circuito; per ridurre la sollecitazione indotta sul campione piastrinico, il tubo di outflow è completamente immerso all'interno del volume di campione piastrinico (EXP) che è presente nella Falcon, evitando così la caduta a cascata delle piastrine, fonte di sollecitazione potenzialmente in grado di attivarle;



**Figura 5.5:** Riserva inserita nel bagno termostatico posto alla temperatura di 37°C.

- iii) Pompa Roller: la pompa Roller (Stöckert Shiley) è una pompa volumetrica da sala operatoria che alloggia un tubo sottopompa in silicone da 1/4 di pollice; il tubo sottopompa è posto all'interno della testa della pompa in un vano semicircolare dove due rulli collegati ad altrettanti bracci, ruotando, lo

comprimono, spingendo così il volume di fluido contenuto nel tubo e generando portata fluente. Tale pompa permette di impostare il valore desiderato di portata, che nel caso degli esperimenti condotti è pari a 500 ml/min, portata nominale dell'ossigenatore Kids D100 durante il suo utilizzo in regime di CEC;

- iv) Ossigenatore: l'ossigenatore Kids D100 (descritto nel dettaglio nel paragrafo 5.2) è collegato a monte alla pompa ed a valle alla riserva (attraverso il tubo di outflow) tramite porzioni di tubo con diametro di 3/16 di pollice.
- v) Tubi e connettori costituenti il circuito idraulico: la lunghezza totale del circuito, pari a 180 cm è stata opportunamente minimizzata al fine di ridurre il più possibile il volume di riempimento del circuito. La minimizzazione del volume di riempimento è fondamentale ai fini dell'esperimento poiché:
- gli ossigenatori utilizzati sono neonatali, pertanto il volume di riempimento del circuito deve essere molto basso al fine di replicare le reali condizioni di lavoro di questi dispositivi;
  - l'obiettivo degli esperimenti è valutare il potenziale trombotico associato ai due diversi modelli di fibra contenuta negli ossigenatori, ossia valutare l'attivazione piastrinica per contatto; pertanto è fondamentale ridurre la sollecitazione a carico delle piastrine causata dagli sforzi di taglio che agiscono sulle piastrine ad ogni passaggio all'interno del circuito, che causano attivazione di tipo meccanico;
  - massimizzare il numero di passaggi del campione piastrinico all'interno dell'ossigenatore; l'intervallo di tempo di durata della prova è limitato al fine di non compromettere la vitalità delle piastrine durante il test o durante il successivo svolgimento del PAS *assay*.
- vi) Trasduttori di pressione: a monte ed a valle dell'ossigenatore sono posti due trasduttori di pressione (Pendotech, S-000) che permettono di monitorare, durante tutta la durata dell'esperimento, la caduta di pressione ( $\Delta P$ ) a cavallo dell'ossigenatore; tale misura è stata effettuata per verificare che durante tutta la

durata dell'esperimento non si generino trombi o coaguli piastrinici (o altri ostacoli al flusso, di qualunque natura) all'interno dell'ossigenatore. Per non alterare la fluidodinamica del circuito, i due trasduttori vengono posti in derivazione rispetto alla direzione del flusso. Il segnale di pressione è acquisito e monitorato in tempo reale tramite un software di acquisizione realizzato in ambiente LabVIEW.

- vii) **Flussimetro:** il flussimetro (Transonic System Inc) permette di monitorare la portata fluente nel circuito. Questo tipo di rivelatore presenta il vantaggio di non essere invasivo, ossia di non alterare in alcun modo la fluidodinamica del circuito: la sonda del flussimetro è infatti montata all'esterno di un tratto di tubo.

Il circuito presenta complessivamente (riserva + circuito idraulico + ossigenatore) un volume di riempimento pari a 80 ml.

Prima di procedere con il test è necessario riempire e debollare il circuito: dopo che il campione EXP è inserito all'interno della riserva (la Falcon da 50 ml) si procede con il riempimento del circuito muovendo manualmente i rulli della pompa; tale operazione, svolta molto lentamente al fine di minimizzare gli stress subiti dalle piastrine, prosegue fino a quando tutto il circuito risulta debollato, cioè fino alla fuoriuscita tutte le bolle d'aria presenti lungo il circuito.

### **5.3 Svolgimento del PAS *assay***

Il Pas *assay*, come descritto nel Capitolo 3, si compone di diverse fasi, elencate di seguito:

1. Prelievo del sangue ed estrazione del PRP;
2. Estrazione del GFP;
3. Conta piastrinica;

4. Preparazione del campione per l'esperimento (EXP) e dei reagenti per condurre il PAS *assay* (Tubes, Wells, FXa);
5. Sonicazione dei campioni piastrinici;
6. Lettura spettrofotometrica dei campioni sonicati e dei campioni di controllo (non sonicati).

A queste, in relazione allo specifico test eseguito, sono aggiunte:

7. Prelievo a tempi (t) predefiniti (t = 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 minuti) di campioni piastrinici dal circuito (ossia i campioni piastrinici che attraversano l'ossigenatore) ed esecuzione del PAS *assay* su tali campioni;

Nel seguito del paragrafo verranno forniti, per ciascuna delle fasi sopraelencate, i dati relativi ai due esperimenti realizzati:

- Esperimento 1: analisi trombogenicità ossigenatore con fibre nude;
- Esperimento 2: analisi trombogenicità ossigenatore con fibre rivestite.

### **5.3.1 Prelievo del sangue ed estrazione del PRP**

Nei due esperimenti pilota condotti è stato utilizzato sangue di origine ovina, prelevato da animale vivo presso una fattoria locale. Il sangue è stato collezionato tramite prelievo dalla giugulare dell'animale facendo uso di una sacca per il sangue (Terumo Blood Bags - CPDA - 1), che contiene già al suo interno la soluzione di anticouagulate (CPDA - 1, composto dagli stessi componenti dell' ACD-A - acido citrico - citrato di sodio - D-glucosio - in concentrazioni lievemente differenti): inserito l'ago nella giugulare, il sangue ricade nella sacca grazie al vuoto ricreato nella sacca stessa. Tramite la sacca si è in grado di collezionare 450 ml di sangue intero.

Per questi due esperimenti pilota, si è preferito utilizzare sangue prelevato da animale vivo nel tentativo di minimizzare il più possibile il rischio di attivare le piastrine durante la fase di collezione del sangue. Il prelievo effettuato da animale macellato (descritto nel paragrafo 3.1.1), infatti, prevede di collezionare il sangue dal fiotto che si genera dalla



giugulare recisa dell'animale durante la macellazione. Tale operazione comporta la caduta per cascata del sangue nel contenitore in PE, che si traduce in un livello non trascurabile di stress per le piastrine. Le piastrine, infatti, giungono in laboratorio già parzialmente attivate: ciò è stato osservato durante lo svolgimento degli esperimenti descritti nel Capitolo precedente (paragrafo 4.5.3): si noti infatti che il livello di attivazione dei campioni di controllo (Tabelle 4.4 e 4.6) non è mai nullo e si assesta, in media, intorno ad un valore di *Abs\_slope* prossimo a 20. Ciò non ha inficiato comunque il buon esito degli esperimenti (ottimizzazione del protocollo di sonicazione) dal momento che la sonicazione ha sempre indotto valori di attivazione dei campioni piastrinici ben più alti di quelli dei controlli; in altre parole è stato sempre possibile discriminare l'attivazione effettivamente indotta dalla sonicazione da quella già "presente" nei campioni sottoposti al test.

Per valutare invece il livello di attivazione indotto dall'utilizzo di un dispositivo (l'ossigenatore Kids D100 nel nostro caso) è invece preferibile partire da una condizione di attivazione piastrinica nulla, o comunque minimizzata, in modo tale da poter apprezzare, tramite il *PAS assay*, anche livelli di attivazione molto bassi indotti dall'utilizzo del dispositivo stesso.

Una volta trasportati in laboratorio, i 450 ml di sangue sono stati filtrati (membrana porosa con porosità circa 40  $\mu\text{m}$ ) al fine di eliminare eventuali coaguli che potrebbero essersi formati durante la fase di raccolta. Successivamente, aliquote di volume di sangue di circa 30 ml sono stati versati dolcemente all'interno di Falcon coniche da 50 ml e sottoposti ad 1 ciclo di centrifugazione a 500g per 15 min (Protocollo 6, paragrafo 4.1) al fine di separare il PRP dalle altre cellule ematiche. In entrambi gli esperimenti condotti, si è proceduto alla centrifugazione di 4 Falcon (ciascuna contenente 30 ml di sangue) al fine di collezionare un volume di PRP sufficiente a condurre l'esperimento.

Il PRP è poi aspirato delicatamente (in modo tale da non sollecitare le piastrine ed indurne l'attivazione) tramite l'utilizzo di una pipetta di *Pasteur* e versato in una nuova Falcon conica da 15 ml, facendo correre il PRP lungo la parete della Falcon in modo tale da minimizzare lo "stress" subito dalle piastrine. Ciascuna Falcon è stata poi posta sullo shaker basculante in attesa della fase successiva dell'esperimento.

### 5.3.2 Ottenimento del GFP

Il GFP è stato ottenuto mediante filtrazione in colonna del PRP. Tale processo, volto ad eliminare tutte le componenti proteiche presenti nel plasma, avviene facendo passare il PRP attraverso la colonna per filtrazione contenente i *beads* (paragrafo 3.5.2). Terminata la filtrazione, la Falcon contenente il GFP è posta sullo shaker basculante in attesa di procedere con le successive fasi del test.

I dati relativi ai due esperimenti condotti - ossigenatore con fibre nude e ossigenatore con fibre rivestite - sono riportati in Tabella 5.1:

Esperimento	# Falcon Centrifugate	Vol PRP [ml]	Vol GFP [ml]
1: fibre_nude	4	40.5	37.5
2: fibre_rivestite	4	45	45

**Tabella 5.1:** Volumi di PRP e GFP ricavati nei due esperimenti.

### 5.3.3 Conta Piastrinica

A seguito della procedura di estrazione del GFP, è stata valutata la concentrazione di piastrine/ $\mu\text{l}$  mediante l'utilizzo del *Coulter Particle Counter*. La conta piastrinica è stata effettuata seguendo il protocollo riportato nel paragrafo 3.1.3.

I dati ottenuti sono riportati in Tabella 5.2:

Esperimento	Concentrazione GFP [#piastrine/ $\mu\text{l}$ ]
1: fibre_nude	$170.8 \times 10^3 \pm 115.3 \times 10^2$
2: fibre_rivestite	$91.1 \times 10^3 \pm 79.6 \times 10^2$

**Tabella 5.2:** Concentrazione di piastrine/ $\mu\text{l}$  del GFP relativo ai due esperimenti.

### 5.3 4 Preparazione dei campioni EXP

La fase successiva ha previsto la preparazione del campione piastrinico EXP, preparato in modo tale che la sua concentrazione sia di  $20 \times 10^3$  piastrine/ $\mu\text{l}$ . Per ottenere la concentrazione desiderata, è stata eseguita la diluizione del GFP con PB 1x e  $\text{CaCl}_2$  50 mM in proporzioni determinate in accordo con le equazioni riportate in Tabella 3.3 (paragrafo 3.1.4).

In particolare, per i due esperimenti si è ottenuto ( $\text{EXP}_1$  e  $\text{EXP}_2$ , Tabella 5.3):

Esperimento	Campione	Vol <sub>EXP</sub> [ml]	Vol <sub>GFP</sub> [ml]	Vol <sub>CaCl<sub>2</sub> 50 mM</sub> [ml]	Vol <sub>PB 1x</sub> [ml]
1: fibre_nude	EXP <sub>1</sub>	200	23.42	12	164.58
2: fibre_rivestite	EXP <sub>2</sub>	200	43.9	12	144.1

**Tabella 5.3:** Volumi di GFP,  $\text{CaCl}_2$  50 Mm e PB 1x per la diluizione dell'EXP.

Infine, sono state preparate le soluzioni *Tubes*, *Wells* e FXa, come descritto nel paragrafo 3.1.6.

### 5.3.5 Sonicazione

Preparati i campioni EXP ed i reagenti necessari per condurre il PAS *assay*, si è proceduto con la sonicazione di due campioni di EXP così da ricavare il massimo valore di attivazione rispetto a cui normalizzare i dati di attivazione dei campioni prelevati dal circuito.

Dall'EXP sono preparati due campioni distinti (S1 e S2, ciascuno pari a 350  $\mu\text{l}$ ) sottoposti poi al protocollo di sonicazione S1\_10s (7W per 10 sec, paragrafo 4.3).

### **5.3.6 Lettura spettrofotometrica**

Come descritto nel paragrafo 3.1.6, terminata la sonicazione, sono prelevati 25  $\mu$ l dal campione contenente le piastrine stimulate e sono aggiunti 70  $\mu$ l della soluzione denominata *Tubes* (soluzione tampone contenente HEPES 20 mM, NaCl 130 mM e albumina di siero bovino (BSA) allo 0.1% nella quale vengono inseriti Ac-FII,  $\text{Ca}^{2+}$  e FXa). I campioni sono incubati per 10 minuti nel bagno termostatico a 37°C e, successivamente, sottoposti alla lettura spettrofotometrica.

Da ciascun campione (S1 e S2 e C1 e C2, che rappresentano, rispettivamente, i due campioni sonicati ed i due campioni non sonicati, utilizzati come controllo) si sono prelevati 10 $\mu$ l di soluzione che sono stati inseriti nei pozzetti dello spettrofotometro, all'interno dei quali erano stati precedentemente inseriti 150 $\mu$ l della soluzione denominata *Wells* (contenente CH-TH e HBS:BSA-EDTA, come descritto nel paragrafo 3.1.4).

Terminata questa fase, si è proceduto all'analisi dei campioni piastrinici prelevati, dal circuito.

### **5.3.7 Prelievo ed analisi dei campioni piastrinici**

Avviata la pompa Roller, si procede con il prelievo dei campioni piastrinici ad istanti di tempo predefiniti ( $t = 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120$  minuti), analizzando così la dinamica del livello di attivazione all'aumentare del numero di passaggi delle piastrine all'interno dell'ossigenatore.

Il prelievo è effettuato tramite una siringa da 1 ml inserita in corrispondenza di una opportuna porta presente nel circuito; tale porta è costituita da un tappo connettore dotato di una membrana che permette di inserire ed estrarre ripetutamente l'ago della siringa mantenendo la sua integrità e quindi garantendo la tenuta idraulica del circuito.

Ciascun campione prelevato è dunque sottoposto alla lettura spettrofotometrica.

I risultati dell'attivazione dei campioni piastrinici sono riportati nel successivo paragrafo.

## 5.4 Risultati e discussione

Al termine dell'analisi spettrofotometrica il grado di attivazione di ciascun campione (campioni di controllo (C), campioni sonicati (S) e campioni prelevati dal circuito ( $t_0 - t_{120}$ ) è valutato in funzione del valore della pendenza della curva che descrive la variazione di assorbanza (Abs) nel tempo del campione piastrinico in esame, ossia il valore di Abs\_slope (paragrafo 4.3).

I risultati ottenuti testando i due differenti ossigenatori nei due esperimenti pilota condotti sono riportati in Tabella 5.4:

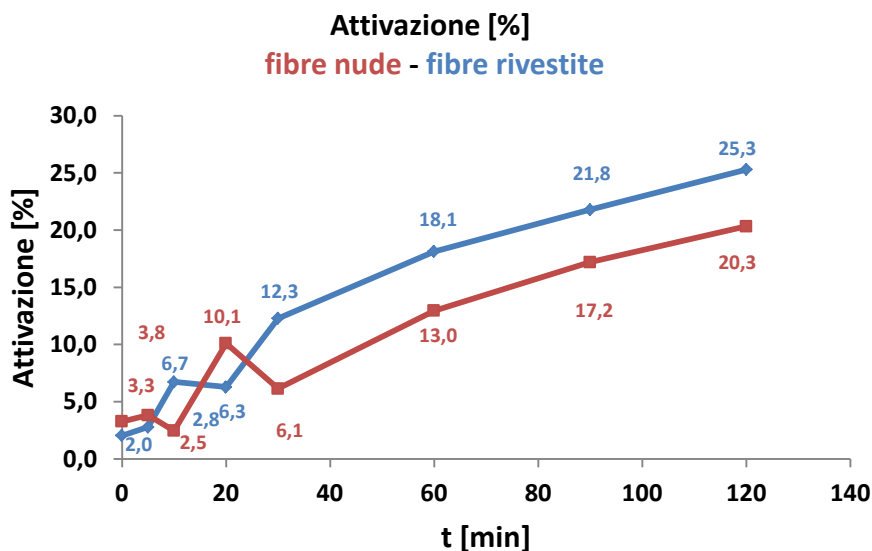
Esperimento	Campione	#Campioni	[(Abs_slope)x10 <sup>3</sup> ]	Attivazione [%]
1: fibre nude	C	2	5.4 ± 0.1	0.0
	t <sub>0</sub>	2	7.8 ± 2.9	3.3
	t <sub>5</sub>	2	8.2 ± 0.2	3.8
	t <sub>10</sub>	1	7,2	2.5
	t <sub>20</sub>	2	12.8 ± 3.2	10.1
	t <sub>30</sub>	2	9.9 ± 1.8	6.1
	t <sub>60</sub>	2	14.9 ± 0.6	13.0
	t <sub>90</sub>	2	18.0 ± 1.8	17.2
	t <sub>120</sub>	2	20.3 ± 2.6	20.3
	S	2	78.7 ± 12.1	100.0
2: fibre rivestite	C	2	4.0 ± 2.4	0.0
	t <sub>0</sub>	2	5.4 ± 2.1	2.0
	t <sub>5</sub>	2	5.9 ± 0.8	2.8
	t <sub>10</sub>	2	8.6 ± 0.4	6.7
	t <sub>20</sub>	2	8.3 ± 2.2	6.3
	t <sub>30</sub>	2	12.4 ± 0.7	12.3
	t <sub>60</sub>	2	16.4 ± 1.2	18.1
	t <sub>90</sub>	2	18.9 ± 4.2	21.8
	t <sub>120</sub>	2	21.3 ± 1.8	25.3
	S	2	72.4 ± 11.1	100.0

**Tabella 5.4:** Valori di attivazione espressi in termini di Abs\_slope e Attivazione % rispetto ai campioni sonicati (S) dei campioni piastrinici prelevati dal circuito con ossigenatore costituito da fibre polimeriche nude (Esperimento 1) e fibre rivestite da fosforilcolina (Esperimento 2).

Il valore di Attivazione % è calcolato normalizzando i dati rispetto al valore di attivazione dei campioni sonicati (S); in dettaglio, prima di effettuare la normalizzazione, è stato

sottratto a tutti i valori di pendenza dei campioni la pendenza dei campioni di controllo (C), il cui valore di Attivazione % è assunto come nullo.

Per consentire un confronto diretto tra i valori di attivazione misurati testando i due differenti modelli di fibra dell'ossigenatore, i dati di Tabella 5.4 sono riportati nel grafico di Figura 5.6:



**Figura 5.6** Attivazione % dei campioni piastrinici misurata nel corso degli esperimenti condotti con ossigenatore con fibre nude e fibre rivestite.

Dal grafico di Figura 5.6 si può comprendere che:

- iii) in entrambi gli esperimenti, il PAS *assay* è stato in grado di discriminare la dinamica di aumento dell'attivazione piastrinica all'aumentare del tempo di permanenza delle piastrine all'interno del circuito, ossia all'aumentare del numero di passaggi dei campioni piastrinici all'interno dell'ossigenatore;
- iv) i risultati di attivazione piastrinica ottenuti nei due esperimenti mostrano come sia la dinamica sia il livello di attivazione piastrinica associati all'ossigenatore con fibre nude e con fibre ricoperte da fosforilcolina risultano confrontabili.

E' possibile quindi concludere che:

- iii) gli esperimenti condotti verificano ancora una volta l'effettiva avvenuta ottimizzazione del protocollo del PAS *assay*; le attività sperimentali svolte nel presente lavoro di tesi hanno quindi consentito la messa a punto di un protocollo in grado di quantificare l'attivazione piastrinica indotta dall'utilizzo di un dispositivo biomedicale per il trattamento del sangue;
- iv) nonostante non si possa trarre alcuna conclusione consistente rispetto ai risultati ottenuti in due soli esperimenti, l'ottenimento di livelli di attivazione piastrinica confrontabili testando le due differenti tipologie di fibre, porta a pensare che l'attivazione possa non essere solo dovuta al contatto con le fibre ma che risulti una combinazione di effetti tra attivazione da contatto e attivazione meccanica, quest'ultima generata dalla sollecitazione imposta alle piastrine all'interno del circuito idraulico. In funzione quindi di questi risultati preliminari, occorrerà prevedere delle modifiche del protocollo di prova al fine di ridurre la sollecitazione delle piastrine e conseguentemente il contributo dovuto all'attivazione meccanica.

In conclusione, nel presente capitolo è stata mostrata un'applicazione del PAS *assay* per la valutazione del rischio trombotico associato all'utilizzo di un modello di ossigenatore neonatale per il trattamento del sangue in regime di CEC. È stato confrontato il livello di attivazione piastrinica indotto dall'utilizzo di: i) ossigenatori costituiti da fibre polimeriche "nude" - ossia prive di trattamento superficiale antitrombotico e ii) ossigenatori dotati di fibre polimeriche rivestite con fosforilcolina, al fine di verificare l'effettivo potenziale di questa molecola nel ridurre i fenomeni di adesione piastrinica e il conseguente rischio di formazione di trombi.

Dai risultati ottenuti nell'esperimento pilota è stata dimostrata l'efficacia e l'utilità del PAS *assay* che ha permesso, in entrambi gli esperimenti, non solo di quantificare il livello di attivazione ma anche di apprezzare la dinamica del fenomeno all'aumentare del numero di passaggi delle piastrine nel dispositivo.

L'ottenimento di risultati di attivazione piastrinica confrontabili nei due esperimenti, può implicare che l'attivazione delle piastrine sia indotta non solo dal contatto con i materiali che costituiscono le fibre dell'ossigenatore ma anche dalla sollecitazione indotta all'interno

del circuito idraulico. In futuro, si dovrà quindi cercare di separare questi due aspetti riducendo l'attivazione di tipo meccanico così da poter poi discriminare al meglio l'attivazione per contatto indotta dai due differenti modelli di fibra. Ad esempio, a tal fine, si suggerisce di ridurre la portata del circuito: è infatti plausibile aspettarsi che a portate più basse il livello di attivazione meccanica si riduca consentendo così di poter apprezzare il livello di attivazione piastrinica associato al solo effetto del contatto delle piastrine con le fibre.



# Capitolo 6

## Conclusioni e sviluppi futuri

### 6.1 Il PAS *assay* come metodo di analisi quantitativa dell'attivazione piastrinica *in vitro*

L'obiettivo generale del presente lavoro di tesi è stato l'ottimizzazione di un protocollo sperimentale per la valutazione del rischio trombotico associato ad alcune classi di dispositivi biomedicali per il trattamento del sangue. Il protocollo è basato sull'analisi dell'attivazione piastrinica *in vitro* attraverso il PAS *assay*, un saggio chimico in grado di quantificare il livello di trombina prodotta dalle piastrine a seguito della loro attivazione.

L'attivazione piastrinica, come discusso nei capitoli iniziali, è un fenomeno che può essere causato da condizioni emodinamiche non fisiologiche che si generano all'interno dei dispositivi (attivazione meccanica) o dal contatto con i materiali artificiali di cui sono costituiti i dispositivi stessi (attivazione per contatto). Tale fenomeno porta all'insorgenza di complicazioni quali formazione di trombi e/o fenomeni tromboembolici, i quali, attualmente, sono limitati nella pratica clinica attraverso trattamento farmacologico che prevede l'assunzione giornaliera di farmaci anticoagulanti da parte del paziente. La minimizzazione del potenziale trombotico associato all'utilizzo dei dispositivi per il trattamento del sangue non è mai stato, fino ad oggi, un criterio di progettazione utilizzato dai costruttori di dispositivi medici. Solo negli ultimi anni, proprio grazie allo sviluppo del PAS *assay* e più in generale della tecnica del DTE, si è iniziato a valutare in fase di progettazione la tromboticità dei dispositivi, a dimostrazione dell'effettiva potenzialità ed utilità del metodo stesso.

Il principale punto di forza del PAS *assay* è la sua enorme versatilità: tale saggio può essere, infatti, accoppiato ad un'analisi numerica (analisi CFD) dell'emodinamica all'interno dei dispositivi, consentendo di quantificare *in vitro* l'attivazione piastrinica (meccanica) indotta da dispositivi differenti e/o da diverse soluzioni progettuali dello stesso dispositivo, anche in assenza di un prototipo fisico del dispositivo in esame. Perciò è possibile limitare la produzione di prototipi e la necessità di numerosi test sperimentali, molto onerosi dal punto di vista economico, da eseguirsi ad ogni modifica introdotta nel dispositivo. Inoltre, il PAS *assay*, presenta il grande vantaggio di poter essere esteso anche a quelle classi di dispositivi in cui l'attivazione piastrinica è maggiormente causata dal contatto con i materiali artificiali che costituiscono il dispositivo in esame, più che dalle sollecitazioni meccaniche.

Nel perseguire l'obiettivo di ottimizzazione dei protocolli sperimentali per condurre il PAS *assay* è stata posta grande attenzione a ciascuna delle fasi del lavoro svolto durante il presente progetto di tesi: i) studio dei meccanismi biologici alla base del fenomeno di attivazione piastrinica, ii) analisi dei protocolli originali provenienti dai ricercatori dell'Università di Stony Brook, iii) preparazione dei reagenti chimici necessari per l'esecuzione dei test, iv) messa in funzione e collaudo degli strumenti richiesti per l'esecuzione dell'*assay*, ed v) ottimizzazione dei protocolli sperimentali.

Lo studio dei meccanismi biologici alla base dei fenomeni di attivazione piastrinica ha consentito di comprendere l'importanza della ricerca in questo campo, finalizzata, come detto, alla riduzione della trombogenicità associata ai dispositivi medici a diretto contatto con il tessuto ematico.

Lo studio e l'analisi dei protocolli originali ha costituito la base di partenza del presente lavoro, consentendo di ricavare una visione generale delle attività da svolgere nelle fasi successive.

La fase di preparazione dei reagenti ha permesso di comprendere al meglio i processi chimici alla base del PAS *assay*; tutti i reagenti sono stati successivamente testati per verificare la loro reattività e per assicurarsi che la loro preparazione fosse stata eseguita correttamente.

La messa in funzione degli strumenti in dotazione al ThLab (colonne cromatografiche, centrifuga, *Coulter Particle Counter*, sonicatore, spettrofotometro ecc...) ci ha consentito di prendere dimestichezza con l'utilizzo di ogni strumento necessario all'esecuzione dei test di attivazione piastrinica; a seguito dell'installazione, ogni strumento è stato sottoposto ad opportune fasi di verifica e collaudo mirate ad analizzarne il corretto funzionamento ai fini dell'esecuzione dei test di attivazione piastrinica.

L'ultima fase di ottimizzazione dei protocolli sperimentali per l'esecuzione del PAS *assay* è stata condotta a partire dai protocolli originali fornitici da Stony Brook, adattando le procedure agli specifici strumenti in dotazione al ThLab; nel perseguire l'obiettivo di definizione di tali protocolli, sono stati svolti numerosi esperimenti. Nella fase di definizione del protocollo di centrifugazione cui sottoporre il sangue, ad esempio, dopo aver verificato la non traslabilità del protocollo definito dai ricercatori di Stony Brook per la centrifugazione di sangue umano, si è proceduto a valutare quali fossero i parametri di processo da utilizzare con la centrifuga a nostra disposizione, considerando inoltre che i campioni di sangue intero da noi utilizzati sono di origine bovina. È stata effettuata un'analisi selettiva di ogni parametro che caratterizza il processo di centrifugazione, variando di volta in volta i) il valore dell'accelerazione, ii) il numero di cicli di centrifugazioni successivi e iii) il tempo di centrifugazione dei campioni, giungendo così alla definizione del protocollo di centrifugazione (500g x 15min) che ci ha consentito di ottenere un volume di PRP con una concentrazione piastrinica ottimale ai fini della esecuzione del PAS *assay*.

Anche nel caso della definizione del protocollo di sonicazione dei campioni piastrinici è stato seguito il medesimo approccio: il protocollo di sonicazione originale fornitoci dall'università di Stony Brook prevedeva una sonicazione di durata pari a 10 sec, perciò le prime prove effettuate sono state svolte seguendo tale indicazione e variando la potenza di sonicazione che il sonicatore in dotazione al ThLab è in grado di erogare, ossia applicando una potenza variabile tra il 10 e il 100% della potenza massima dello strumento. Al termine di questa fase sperimentale sono stati analizzati i risultati ottenuti in termini di attivazione piastrinica e percentuale di danno arrecato alle piastrine stimolate, giungendo così all'individuazione della potenza ottimale con cui effettuare la procedura di sonicazione (pari a 7 W ossia al 10% della potenza massima ottenibile con il sonicatore) al fine di ottenere il massimo livello di attivazione piastrinica ma limitando al tempo stesso la

percentuale di piastrine danneggiate. In una seconda fase è stato poi valutato l'effetto della durata di applicazione dello stimolo in modo tale da definire quale fosse la durata della sollecitazione da applicare sul campione piastrinico per ottenere il massimo valore di attivazione, garantendo, anche in questo caso, la preservazione del campione piastrinico. La combinazione di queste due fasi sperimentali ha consentito di individuare la procedura di sonicazione ottimale cui sottoporre i campioni durante in PAS assay (7 W per 10 sec).

Il lavoro effettuato al fine di ottimizzare il protocollo per eseguire il PAS assay ha comportato diversi momenti critici, che hanno richiesto di rivedere alcuni aspetti definiti in precedenza:

- i) Durante le fasi di collaudo degli strumenti la maggior criticità non è stata il comprendere il funzionamento degli strumenti, ma è stata l'adattarne i parametri di funzionamento ai nostri fini sperimentali. Durante le prime fasi di studio del funzionamento del *Coulter Particle Counter*, ad esempio, si è giunti a comprendere la necessità di effettuare diverse prove di calibrazione al fine di ottimizzare le prestazioni dello strumento in funzione della specifica applicazione, ossia la lettura della concentrazione del campione EXP ( $20 \times 10^3$  piastrine/ $\mu\text{l}$ );
- ii) Nelle prime analisi relative alla valutazione dell'indice di rifrazione di alcuni reagenti quali il PB 1x e il SA 0.05%, il rifrattometro forniva valori differenti rispetto a quelli descritti nei protocolli forniti dai ricercatori di Stony Brook. Dopo aver valutato nuovamente la corretta preparazione dei reagenti, grazie ad ulteriori ricerche effettuate si è giunti a comprendere come il rifrattometro in dotazione al ThLab presenti una scala di misura differente rispetto a quella dello strumento presente a Stony Brook; lo strumento da noi utilizzato, in particolare, richiede che sia effettuata una conversione del valore indicato per poter effettuare un confronto diretto con i dati dei protocolli originali.
- iii) Altre criticità sono state riscontrate durante l'esecuzione dei test preliminari per l'ottimizzazione dei protocolli sperimentali per il PAS assay: nel valutare il livello di attivazione (Abs\_slope) dei campioni piastrinici non stimolati (controlli) ci si è resi conto di come i valori di attivazione variassero molto al variare del campione di sangue utilizzato per il test, al di là dell'aspettata

variabilità biologica. Un'analisi più approfondita dei dati ottenuti attraverso i diversi esperimenti condotti ha consentito di comprendere come la modalità di collezione del sangue può influire notevolmente sui risultati del test : i campioni piastrinici derivati da sangue di animale macellato presentano un valore di attivazione dieci volte maggiore rispetto ai campioni piastrinici derivati da sangue ottenuto tramite prelievo da animale vivo, presumibilmente a causa dello “stress” subito dalle piastrine nel momento della raccolta del sangue; ciò ha portato a preferire la seconda modalità di collezione del sangue nel momento in cui si sono svolti i test sull'ossigenatore Kids D100;

- iv) Altre criticità si sono rivelate durante l'esecuzione di specifiche fasi dell'*assay*: inizialmente, infatti, la preparazione del campione EXP era effettuata aggiungendo tutti i reagenti (GFP, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, PB 1x) contemporaneamente. Nella valutazione dei risultati di attivazione piastrinica però, ci si è accorti di come gli ultimi campioni analizzati (sottoposti a sonicazione circa 40 minuti dopo la preparazione dell'EXP) presentassero sempre un livello di attivazione inferiore rispetto ai primi. Un'analisi approfondita dell'attività dei vari reagenti utilizzati ci ha permesso di comprendere come il CaCl<sub>2</sub>, potente attivatore dell'attivazione piastrinica, abbia un effetto limitato nel tempo e come, pertanto, passati 40 minuti dal momento del suo inserimento all'interno del campione piastrinico, tale effetto fosse quasi del tutto decaduto. Negli esperimenti successivi, quindi, il CaCl<sub>2</sub> è stato inserito nell'EXP solo pochi minuti prima di effettuare la lettura in spettrofotometria.

Nonostante le criticità incontrate, la metodologia di analisi che è stata adottata ha portato alla risoluzione di ciascuna di esse e ha consentito di definire un protocollo in cui, in ciascuna fase, ciascun parametro è stato definito in funzione di un'attenta analisi del suo effetto. I test e le prove effettuati successivamente hanno confermato il raggiungimento dell'obiettivo prefissato all'inizio del presente lavoro.

Il PAS *assay* così definito rappresenta un potente strumento in grado non solo di evidenziare delle differenze nel livello di attivazione delle piastrine sottoposte ai diversi protocolli di sonicazione descritte all'interno di questo elaborato, ma è anche, e soprattutto,

in grado di contribuire allo studio e all'analisi della trombogenicità associata a diversi dispositivi per il trattamento del sangue, come dimostrato dai test effettuati con i due differenti modelli di ossigenatori neonatali. L'applicazione del PAS *assay* nelle fasi iniziali di progettazione dei dispositivi può portare a notevoli benefici sia per le aziende, che potranno valutare il potenziale trombogenico associato ai dispositivi *in vitro* prima della realizzazione dei prototipi, sia per i pazienti, che saranno portatori di dispositivi le cui possibili complicazioni in termini di trombogenicità siano state analizzate ed eventualmente minimizzate in fase di progettazione. La progettazione dei dispositivi che includa anche la minimizzazione del rischio trombogenico consentirà in futuro di ridurre o del tutto eliminare le terapie anticoagulanti cui sono sottoposti i pazienti portatori di tali dispositivi.

## 6.2 Sviluppi futuri

Il principale sviluppo futuro delle attività condotte nell'ambito del presente lavoro nasce come conseguenza diretta dei risultati ottenuti durante le ultime fasi del lavoro stesso, ossia l'analisi della trombogenicità indotta dai due modelli di fibra (nuda e rivestita con fosforilcolina) contenute nei due differenti ossigenatori testati.

Nonostante non sia possibile trarre considerazioni definitive dai test condotti, a causa del numero limitato di esperimenti effettuati, i risultati ottenuti sono di sicuro promettenti. Il PAS *assay* è stato, infatti, in grado di rilevare la dinamica temporale dell'attivazione piastrinica dell'ossigenatore testato nelle sue tipiche condizioni di lavoro in sala operatoria.

I risultati ottenuti finora non mostrano differenze statisticamente significative del grado di attivazione delle piastrine sottoposte al ripetuto passaggio attraverso i due differenti modelli di ossigenatore. L'ipotesi avanzata è che l'attivazione indotta sia provocata da una combinazione di effetti prodotti dall'attivazione da contatto e dall'attivazione meccanica. Per poter discriminare i due effetti sarà necessario svolgere quindi ulteriori test replicando le condizioni sperimentali degli esperimenti finora condotti ma variando alcuni parametri di processo al fine di ridurre la sollecitazione meccanica indotta all'interno del circuito idraulico utilizzato per il test, variando, ad esempio, la portata imposta dalla pompa. In tal modo, si potrà quindi procedere con uno studio più approfondito volto alla definizione del

rischio trombotico associato a questi dispositivi, discriminando dunque l'attivazione meccanica e da contatto; nello specifico si cercherà di determinare se a portate più basse l'attivazione meccanica delle piastrine è effettivamente minore, giungendo quindi a poter apprezzare differenze statisticamente significative nel confronto tra i due modelli di fibra. In definitiva, gli studi qui proposti potranno determinare se la fosforilcolina risulta essere un rivestimento efficace per la diminuzione della trombogenicità del dispositivo.

In ultimo, come descritto nel Capitolo 2, il PAS *assay* è il saggio chimico utilizzato nel metodo definito DTE, che prevede l'utilizzo dell'HSD per la replica *in vitro* delle sollecitazioni indotte da un dispositivo. Presso il ThLab è presente un prototipo di HSD, attualmente in fase di collaudo. Terminata la fase di collaudo preliminare, l'HSD potrà essere utilizzato in combinazione con le analisi CFD ed il PAS *assay* per quantificare la trombogenicità di una vasta gamma di dispositivi per il trattamento del sangue.

## APPENDICE A

### Protocolli di preparazione dei reagenti per PAS assay

#### I. Reagenti per la preparazione della colonna

##### Platelet Buffer 10x (PB 10x)

REAGENTI	QUANTITA'
NaCl	36.53 g
Hepes	11.90 g
D-(+)-glucose	22.50 g
KCl	1.01 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.36 g
MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	2.03 g
Na <sub>3</sub> Citrate 6H <sub>2</sub> O (tri-sodio citrato diidrato)	1.47 g
Bovine Serum Albumin (BSA)	5.00 g
Acqua ultrapura	450 ml

1. Diluire tutti i reagenti in 450 ml di acqua ultrapura mescolando con una spatola, assicurandosi che il BSA non faccia schiuma, per ottenere 500 ml di soluzione.
2. Distribuire accuratamente in aliquote da 25 ml ( $\pm 0.5$  ml).
3. Congelare le aliquote a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### Platelet Buffer 1x (PB 1x)

REAGENTI	QUANTITA'
Acqua ultrapura	225 ml
Platelet Buffer 10x	25 ml

*N.B. Il giorno prima dell'esperimento scongelare il numero di aliquote necessarie per l'esperimento da 25 ml di Platelet Buffer 10X e conservare in frigorifero ( $+4^{\circ}\text{C}$ ).*



1. Sciacquare una beuta con beccuccio laterale da 500 ml con acqua distillata e asciugarla.
2. Etichettare la beuta con denominazione “ *Platelet Buffer 1X + data gg/mm/aa*”.
3. Riempire la beuta con 225 ml di acqua ultrapura (farla scorrere un po' prima di usarla).
4. Tappare la beuta con il tappo di gomma.
5. Aggiungere 25 ml di Platelet Buffer 10X in modo da diluirlo e tappare nuovamente la beuta.
6. Mettere la beuta nel bagno termostato ( a 37 °C) per circa 20 minuti (appuntarsi l'ora).
7. Controllare che il pH sia  $7.4 \pm 0.02$ ; in caso contrario:
  - Se  $\text{pH} < 7.4$  aggiungere poche gocce di NaOH 10 M
  - Se  $\text{pH} > 7.4$  aggiungere poche gocce di Tris-HCl 2 M

### **Sodio Azide 0,05%**

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
Acqua distillata	148.5 ml
Sodio Azide 5%	1.5 ml

1. Aggiungere Sodio Azide 5% in acqua distillata.
2. Mescolare.
3. Conservare a temperatura ambiente.

## II. Reagenti per la pulizia dei *beads* e della colonna

### SDS (Sodio DodecilSolfato) 20%

REAGENTI	QUANTITA'
Acqua distillata	200 ml
SDS	40 g

1. Mescolare e scaldare fino a completo scioglimento.
2. Conservare a temperatura ambiente.

### 0.5% SDS

REAGENTI	QUANTITA'
Acqua distillata	500 ml
SDS	2.5 g

1. Mescolare fino a completo scioglimento.
2. Conservare a temperatura ambiente.

### 0.5% SDS + 50 mM NaOH

REAGENTI	QUANTITA'
Acqua distillata	500 ml
SDS	2.5 g
NaOH 10 M	2.5 ml

1. Mescolare fino a completo scioglimento.
2. Conservare a temperatura ambiente.

### **Candeggina 10%**

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
Candeggina 12%	1250 ml
Acqua distillata	250 ml

1. Diluire la candeggina in acqua distillata.
2. Conservare a temperatura ambiente.

### **Sodio Azide 5%**

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
Acqua distillata	200 ml
Sodio Azide	10 g

1. Diluire il Sodio Azide in acqua distillata.
2. Mescolare fino a completo scioglimento.
3. Conservare a temperatura ambiente.

### III. Reagenti per PAS assay

**Reagenti per TUBES** (Reagenti che andranno a riempire le vials eppendorf con i campioni per ciascun esperimento)

#### HBS:BSA (\*)

REAGENTI	QUANTITA'
Acqua distillata	450 ml
HEPES 20 mM	2.383 g
NaCl 130 mM	3.80 g
BSA 0.1%	0.5 g

1. Sciogliere i reagenti in 450 ml di acqua distillata.
2. Controllare che il pH sia 7.4. In caso contrario:  
Se pH < 7.4 aggiungere poche gocce di NaOH 10M;  
Se pH > 7.4 aggiungere poche gocce di Tris-HCl 2M.
3. Aggiungere acqua distillata per arrivare ad ottenere 500 ml di soluzione.
4. Aliquotare e conservare a -2°C - -8°C.

#### CaCl<sub>2</sub> 50 mM

REAGENTI	QUANTITA'
Acqua distillata	47.5 ml
CaCl <sub>2</sub> 1 M (*)	2.5 ml

1. Aggiungere CaCl<sub>2</sub> 1 M a 47.5 ml di acqua distillata.
2. Controllare l'indice di rifrazione ( $n \approx 1.3343 \rightarrow$  sul rifrattometro Brix  $\approx 1^\circ$ ).
3. Porre il CaCl<sub>2</sub> 50 mM in una Falcon conica da 50 ml e conservare in frigorifero (+ 4°C).

*N.B. E' consigliabile **NON** utilizzare CaCl<sub>2</sub> mantenuto in frigorifero per più di 20-30gg. Il suo utilizzo comporta infatti valori di attivazione più bassi della norma.*

(\*) Per ottenere  $\text{CaCl}_2$  1 M:

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
Acqua distillata	100 ml
$\text{CaCl}_2$	14.702 g

1. Sciogliere  $\text{CaCl}_2$  in acqua distillata.
2. Controllare l'indice di rifrazione ( $n \approx 1.3581 \rightarrow$  sul rifrattometro Brix  $\approx 16^\circ$ ).
3. Conservare in frigorifero ( $+ 4^\circ\text{C}$ ).

### **F II + HBS:BSA-PEG**

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
F II	12 $\mu\text{l}$
HBS:BSA-PEG	48 $\mu\text{l}$

1. In una vial eppendorf da 650  $\mu\text{l}$  preparare F II + HBS:BSA-PEG aggiungendo 12  $\mu\text{l}$  di F II (conservato in freezer a  $- 80^\circ\text{C}$ ) con 48  $\mu\text{l}$  di HBS:BSA-PEG (conservato in frigorifero a  $+ 4^\circ\text{C}$ ).
2. Pipettare ripetutamente su e giù per mescolare.

*N.B. Per preparare HBS:BSA-PEG 6000 è necessario preparare prima HBS:BSA, come descritto sopra (\*).*

Per preparare HBS:BSA-PEG 6000(\*\*):

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
HBS:BSA	30 ml
PEG 6000	0.30 g

1. Aggiungere il PEG 6000 ad HBS:BSA.
2. Mescolare fino a completo scioglimento.
3. Conservare in frigorifero ( $+ 4^\circ\text{C}$ ).

**Reagenti per WELLS** (per i pozzetti dello spettrofotometro)

**HBS:BSA + 5 mM EDTA**

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
HBS:BSA	30 ml
EDTA 0.2 M	750 µl

1. Aggiungere l'EDTA ad HBS:BSA.
2. Mescolare la soluzione.
3. Conservare in frigorifero a +4°C.

*N.B. Per preparare HBS:BSA seguire il protocollo descritto sopra (\*).*

Per preparare EDTA 0.2 M:

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
Acqua distillata	85 ml
EDTA	7.45 g

1. Sciogliere l'EDTA in 85 ml di acqua distillata.
2. Mescolare per 30 minuti circa.
3. Controllare che il pH sia 7.4 (in caso contrario aggiungere poche gocce di NaOH 10 M).
4. Aggiungere acqua distillata per ottenere un volume finale di soluzione pari a 100 ml.
5. Conservare a temperatura ambiente.

**CH-TH**

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
Acqua distillata	151 ml
NaCl 0.15 M	1.3 g
CH-TH	100 mg (1 flacone)

1. Con una pipetta Pasteur assicurarsi che tutto il CH-TH finisca nella soluzione.
2. Agitare fino a completo scioglimento.
3. Conservare in aliquote da 30 ml in freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Reagenti per il Fattore X attivato (FXa)**

#### **FX**

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
FX	2.4 $\mu\text{l}$
HBS:BSA – PEG	117.6 $\mu\text{l}$

*N.B. Questa operazione deve essere svolta vicino al freezer, dove è riposto il Fattore X, in modo da minimizzare lo sbalzo termico per il Fattore X. Il Fattore X così preparato diventa attivo quando entra in contatto con il campione piastrinico.*

Per la preparazione di HBS:BSA – PEG attenersi al protocollo sopra descritto (\*\*).

1. In una vial eppendorf da 650  $\mu\text{l}$  inserire 117,6  $\mu\text{l}$  di HBS:BSA – PEG.
2. Prelevare 2,4  $\mu\text{l}$  di Fattore X dal freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  e mescolarli con HBS:BSA – PEG pipettando su e giù o via vortex.
3. Conservare tutto in ghiaccio.

## IV. Reagenti per l'acetilazione della Protrombina

### 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/ 1 mM EDTA

REAGENTI	QUANTITA'
Acqua distillata	2 l
NaHCO <sub>3</sub>	16.802 g
EDTA 0.2 M	10 ml

1. Aggiungere NaHCO<sub>3</sub> e EDTA 0.2 M a 2 l di acqua distillata.
2. Mescolare fino a completo scioglimento.
3. Conservare in frigorifero.

### 0.15 M NaCl/ 1 mM EDTA/ 1 mM MES

REAGENTI	QUANTITA'
Acqua distillata	2 l
NaCl	17.532 g
EDTA 0.2 M	10 ml
MES	0.39 g

1. Aggiungere i reagenti in acqua distillata.
2. Mescolare fino a completo scioglimento.
3. Misurare il pH ( $\approx 6$ ). Se pH < 6 aggiungere poche gocce di NaOH.

### 300 mM SNSA in DMSO (da preparare prima dell'utilizzo)

REAGENTI	QUANTITA'
DMSO	1.29 ml
SNSA	100 mg (1 flacone)



1. Prelevare 1.29 ml di DMSO utilizzando una pipetta graduata e inserirli nel flacone contenente l'SNSA.
2. Pipettare ripetutamente su e giù per mescolare.
3. Conservare in freezer a -20°C.

### **CaCl<sub>2</sub> 50 mM**

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
Acqua distillata	47.5 ml
CaCl <sub>2</sub> 1 M	2.5 ml

1. Aggiungere CaCl<sub>2</sub> 1 M a 47,5 ml di acqua distillata.
2. Controllare l'indice di rifrazione ( $n \approx 1.3343 \rightarrow$  sul rifrattometro Brix  $< 2,6^\circ$ ).
3. Inserire la soluzione ottenuta nella falcon.
4. Conservare in frigorifero (+ 4°C).

### **Protrombina (FII) 121 μM**

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
Acqua distillata	1 ml
Protrombina (FII)	8.7 mg ( $\approx$ 9 flaconi)

1. Inserire la quantità necessaria di protrombina in un flacone.
2. Prelevare 1 ml di acqua distillata con la pipetta graduata e inserirlo nel flacone.
3. Pipettare ripetutamente su e giù per mescolare.
4. Conservare in freezer a -40°C.

## Tris – HCl 2M

<b>REAGENTI</b>	<b>QUANTITA'</b>
Acqua distillata	31.25 ml
Trizma – HCl	9.85 g

1. Pesare il Trizma – HCl e scioglierlo in acqua distillata.
2. Inserire la soluzione ottenuta nella falcon.
3. Conservare a temperatura ambiente.

## Appendice B

### Protocolli per lo svolgimento del PAS assay

#### I. Preparazione Platelet Buffer 1x

##### Preparazione 250 ml di PB 1x

8. Scongellare un'aliquota da 25 ml di PB 10x.
9. Sciacquare una beuta con beccuccio laterale da 500 ml con acqua distillata e asciugarla.
10. Etichettare la beuta con denominazione “ *Platelet Buffer 1X + data gg/mm/aa*”.
11. Riempire la beuta con 225 ml di acqua ultrapura.
12. Aggiungere 25 ml di Platelet Buffer 10x, diluirlo, e tappare la beuta.
13. Mettere la beuta nel bagno termostato (37 °C) per circa 20 minuti.
14. Controllare che il pH sia  $7.4 \pm 0.02$ ; in caso contrario:
  - Se  $\text{pH} < 7.4$  aggiungere poche gocce di NaOH 10 M
  - Se  $\text{pH} > 7.4$  aggiungere poche gocce di tris-HCl 2 M

*Nota: NaOH 10 M è più forte di tris-HCl 2 M, quindi ne occorreranno meno gocce*
15. Misurare nuovamente il pH (ricordandosi di agitare leggermente la soluzione prima della misura).
16. Scrivere sull'etichetta della beuta il valore di pH misurato.
17. Prelevare la beuta dal bagnetto e *degasare* il Platelet Buffer 1x con pompa a vuoto seguendo il protocollo riportato sotto.

##### Degasamento del PB 1x con pompa a vuoto

1. Collegare la pompa a vuoto al beccuccio laterale della beuta.
2. Degasare per 2-3 minuti.

3. Coprire il beccuccio laterale con parafilm.
4. Riporre la beuta nel bagno termostato (37°C) fino al suo utilizzo durante l'esperimento.

## **II. Preparazione della colonna per filtrazione**

### **Rimozione del Sodio Azide 0.05% dalla colonna e riempimento con PB 1x**

1. Posizionare un becher da 250ml al di sotto della colonna (collezione fluido canale outflow).
2. Collegare tramite il rubinetto tre vie il tubicino di ingresso della colonna con il tubo di mandata della pompa.
3. A pompa spenta, aprire il canale di outflow della colonna (tramite tre vie) e svitare il tappo superiore della colonna per favorire la fuoriuscita del sodio azide per gradiente gravitazionale (mantenere il tappo appoggiato sul bordo superiore della colonna).
4. Inserire il tubo di pescaggio della pompa nella beuta contenente il Platelet Buffer 1x.

*Nota: assicurarsi che il tubo di pescaggio "peschi" sempre fluido; inoltre, il beccuccio laterale della beuta deve restare tappato con parafilm, mentre l'accesso superiore deve restare coperto dal tappo (appena appoggiato - no press\_fit).*

5. Misurare il Refractive Index (R.I.) del fluido collezionato dall'outflow della colonna (valore atteso R.I.  $\approx 0^*$  poiché ho solo sodio azide 0.05%).

*Attenzione: assicurarsi che i beads siano sempre ricoperti da uno strato di fluido (Sodio Azide) in modo da non lasciare che secchino. Se necessario, aggiungere Platelet Buffer con una pipetta. Far sì che il fluido scorra lungo la parete della colonna.*

6. Azionare la pompa roller e regolare la velocità della pompa (tensione di alimentazione) in modo da avere un livello stabile del menisco di PB 1x sulla superficie dei beads.

7. Dopo aver erogato circa 150ml di PB 1x (monitorare il volume nel becher graduato posto sotto il canale di outflow della colonna), effettuare delle misure di R.I. tramite rifrattometro.
8. Fermare la pompa quando R.I. circa = 1.5\*. In questo momento si è sicuri che tutto il Sodio Azide sia stato rimosso e sostituito da PB 1x.
9. Chiudere il canale di outflow della colonna (tramite rubinetto tre vie) ed avvitare nuovamente il tappo superiore della colonna.
10. Riporre la beuta con il PB1X in bagno termostato (37°C, servirà più avanti nel corso dell'esperimento).

*\* I valori di R.I. riportati sui protocolli americani indicavano un R.I. del SA 0.05% pari a 0 e un R.I. del PB 1x pari a 20.*

*L'unità di misura relativa ai protocolli originali è  $(n-n_0) \times 10^4$  T/C, dove n è l'indice rifrattivo della soluzione in analisi e  $n_0$  è l'indice rifrattivo dell'acqua a 20°C. L'unità di misura del rifrattometro in dotazione al ThLab è invece i Brix%.*

### **III. Estrazione delle piastrine dal sangue**

#### **Centrifugazione del sangue intero (30 ml)**

1. Pesare la Falcon contenente il sangue, contenuta nell'holder della centrifuga, avendo cura di svitare il tappo ma pesando anch'esso. Effettuare almeno tre misure, prendere nota del peso.
2. Pesare la Falcon (insieme ad holder e tappo) contenente acqua ed aggiungere/rimuovere acqua finchè il peso non eguagli quello della Falcon + holder + tappo (tolleranza ammissibile pari alla risoluzione della bilancia - ultima cifra significativa è la seconda decimale).
3. Introdurre le due Falcon nella centrifuga ai poli opposti.
4. Centrifugare a **500 g** per **15 minuti**.

N.B. Nel caso in cui vengano preparate due Falcon contenenti circa 30 ml di sangue intero saltare i punti 1 e 2 e passare direttamente al punto 3.

### **Raccolta del Platelet Rich Plasma (PRP)**

1. Prendere una Falcon da 15 ml ed etichettarla come **PRP**.
2. Prelevare *con cautela* il PRP dalla Falcon di sangue centrifugato tramite una pipetta Pasteur, facendo molta attenzione a non aspirare la parte di globuli rossi depositata sul fondo. Si dovrebbero ottenere circa **9 – 10 ml** di PRP.
3. Appuntare l'orario di raccolta del PRP.
4. Collocare la Falcon da 15ml contenente il PRP sul *Gentle Orbital Shaker*. Azionare lo strumento.

### **Filtraggio del PRP nella colonna – Ottenimento del Gel Filtered Platelets (GFP)**

1. La colonna è stata precedentemente riempita con PB 1x (*vedi protocollo II*). R.I. ≅
  1. Assicurarsi che la pompa sia collegata alla beuta contenente il PB 1x.
2. Aprire il tappo superiore della colonna ed immettere il PRP nella colonna con una pipetta Pasteur facendo correre il fluido lungo le pareti della colonna e con movimenti circolari.
3. Appoggiare il tappo superiore sulla colonna senza avvitarlo.
4. Annotare l'orario di inserimento del PRP nella colonna.
5. Attendere che il **PRP filtri attraverso i beads** (finchè non si inizia a intravedere la superficie del gel).
6. Avvitare il tappo superiore della colonna e **attivare la pompa roller per immettere PB 1x**, imponendo una velocità tale da mantenere i beads sempre ricoperti di buffer e con livello di menisco stabile.

*Attenzione a non far mai seccare i beads. Se necessario, aggiungere manualmente PB 1x usando una pipetta.*

7. Osservare la *torbidità* del liquido in uscita dalla colonna. Se il colore del filtrato da trasparente diventa grigiastro e denso, vuol dire che si inizia a collezionare GFP. Collezionare il GFP in una Falcon da 15 ml in corrispondenza dell'uscita della colonna. Collezionare *esattamente* un volume di GFP pari a quello di PRP inserito nella colonna (o poco meno).
8. Etichettare la Falcon come GFP e annotare l'orario di raccolta e il volume raccolto.
9. Collocare la Falcon con GFP sul *Gentle Orbital Shaker*.

### **Riempimento della colonna con Sodio Azide 0.05%**

1. Togliere il tubicino di pescaggio della pompa roller dalla beuta contenente il PB1X e inserirlo nella bottiglia con Sodio Azide 0.05%, assicurandosi che il tubo sia ben immerso per non pescare aria.
2. Riporre il PB 1x nel bagno termostato (37°C).
3. Svitare il tappo superiore della colonna ed azionare la pompa. Erogare un volume di Sodio Azide 0.05% almeno pari al volume di PB 1x precedentemente immesso in colonna.
4. Quando si è erogato il volume target di Sodio Azide 0.05%, misurare il R.I. e fermare la pompa quando **R.I.=0**.
5. Lavare la superficie esterna del tubicino di outflow della colonna spruzzando dell'acqua ultrapura.
6. Avvitare il tappo superiore della colonna accuratamente e chiudere i tubicini di ingresso e di uscita della colonna tramite il rubinetto tre vie.
7. Richiudere la bottiglia di Sodio Azide 0.05% e riporla nell'armadio.

*Nota: il riempimento con Sodio Azide 0.05% deve essere fatto solo al termine dell'esperimento ovvero quando si è terminato di filtrare tutti i campioni di PRP previsti dall'esperimento. Il Sodio Azide 0.05% serve a "conservare" i beads in colonna fino al giorno del successivo esperimento.*

#### **IV. Conta delle piastrine**

*N.B. Prima di procedere alla lettura dei campioni, assicurarsi che lo strumento sia stato calibrato. L'operazione di calibrazione deve essere effettuata almeno una volta al mese. Per il protocollo di calibrazione è riportato al termine del paragrafo.*

1. Inserire in una *cup* 10 $\mu$ l di GFP in 10 ml di soluzione isotonica (soluzione fisiologica).
2. Accendere il Coulter Counter.
3. Aprire lo sportello. Far scorrere il sostegno verso il basso e inserire la *cup* nell'apposito alloggiamento.
4. Riposizionare il sostegno in alto in modo che l'*apertura* sia totalmente immersa nel campione da analizzare.
5. Assicurarsi che l'*apertura* sia a fuoco, in caso contrario aggiustare il fuoco utilizzando l'apposita rotella.
6. La prima schermata ad apparire sullo schermo sarà la schermata S1. Inserire i valori dei parametri di interesse utilizzando la tastiera:
  - Select Units:  $\mu$ m
  - Set Upper Size: 2.3  $\mu$ m
  - Set Lower Size: 4  $\mu$ m
  - Count Mode: Between
7. Premere SET-UP.
8. Apparirà S2. I valori da inserire sono:
  - Select Aperture: 100  $\mu$ m
  - Metered Volume: 0.1 ml
9. Da S2 premere START. Lo strumento calcola i valori di Gain e Current adeguati ai valori di T1 e Tu precedentemente inseriti. Se i valori di Gain e Current impostati in precedenza sono adeguati alle soglie inserite, apparirà la schermata di conta A2, altrimenti apparirà S7 con i nuovi valori di Gain e Current calcolati dalla macchina. Per procedere nella lettura del campione, da S7 premere START.



10. Lo strumento inizierà ad analizzare il campione (schermata A2). È possibile che possano verificarsi degli errori (nel caso si presentino errori fare riferimento al paragrafo *Errori in fase di conta*).

Al termine dell'elaborazione dello strumento comparirà la schermata con il risultato.

11. La concentrazione di piastrine/ $\mu\text{l}_{\text{GFP}}$  si ottiene moltiplicando il risultato restituito dallo strumento per 10 \*.

12. Completare la scheda per la preparazione dei reagenti da utilizzare per il PAS in funzione del numero di piastrine contate nel campione di GFP (si veda Protocollo V - Preparazione Reagenti per PAS ASSAY).

\* *Moltiplicare il risultato restituito dallo strumento per 10 è necessario per utilizzare la formula riportata al punto 5 del protocollo V (PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DA CUI PRELEVARE I CAMPIONI PER OGNI ESPERIMENTO (Exp\_1, Exp\_2, ... Exp\_N)). Tale formula è stata infatti calcolata in modo che il #**piastrine\_contate** si riferisca ad un volume di GFP pari a 100  $\mu\text{l}$  in 10 ml di soluzione fisiologica. In questo protocollo di conta delle piastrine si utilizzano solamente 10  $\mu\text{l}$  di GFP in 10 ml di soluzione fisiologica, pertanto, per poter utilizzare questa formula, è necessario moltiplicare il risultato ottenuto dalla lettura dello strumento per 10.*

*La lettura deve essere svolta su ciascun campione per tre volte. Effettuare la lettura su 2 campioni distinti (10  $\mu\text{l}$  di GFP in 10 ml di soluzione fisiologica).*

*N.B. Prima di preparare le cup con 10  $\mu\text{l}$  di GFP in 10 ml di soluzione fisiologica contare il numero di particelle presenti in due campioni di bianco (10 ml di soluzione fisiologica) e assicurarsi che il risultato restituito dallo strumento sia  $< 400$ . Per pulire l'apertura da eventuali particelle rimaste adese durante le letture precedenti svolgere la funzione Flush Aperture.*

*Esempio (sangue umano):*

<b><i>Letture Bianco (Soluzione Fisiologica)</i></b>	
<b><i>Bianco 1</i></b>	<b><i>Bianco 2</i></b>
<b><i>135</i></b>	<b><i>192</i></b>

<b>Letture Campioni (10 µl di GFP in 10 ml di Soluzione Fisiologica)</b>	
<i>Campione 1</i>	<i>Campione 2</i>
23975	22528
24308	22384
24390	22240

La media delle 6 letture è:

$$(23975 + 24308 + 24390 + 22528 + 22384 + 22240) / 6 = \mathbf{23304.1}$$

La concentrazione piastrine/µl<sub>GFP</sub> si ottiene moltiplicando la media ottenuta per 10:

$$\text{piastrine}/\mu\text{l}_{\text{GFP}} = \mathbf{23304.1 * 10 = 233041}$$

La formula da applicare, riportata al punto 5 del protocollo V (PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DA CUI PRELEVARE I CAMPIONI PER OGNI ESPERIMENTO (Exp\_1, Exp\_2, ... Exp\_N), è perciò la seguente:

$$\text{Volume GFP} = 20 \times 10^3 \times X_{\text{ml}} \times \text{piastrine}/\mu\text{l}$$

Dove  $X_{\text{ml}}$  rappresenta il volume della soluzione Exp\_i che verrà utilizzata per svolgere l'esperimento.

### **Calibrazione del Counter Particle Counter**

La soluzione utilizzata per la calibrazione ha una concentrazione pari a 0.11% [p/p] di ORGASOL in soluzione fisiologica. Viene inserita una goccia di Triton X.

Le particelle di ORGASOL hanno un diametro nominale di  $10 \pm 2 \mu\text{m}$ .

1. Inserire 5 gocce di questa soluzione in 20 ml di soluzione fisiologica contenuti in una *cup*.
2. Tappare e capovolgere ripetutamente la *cup* in modo tale da distribuire omogeneamente le particelle di orgasol.
3. Accendere lo strumento.
4. Aprire lo sportello e posizionare la *cup* nell'apposito alloggiamento. Assicurarsi che l'*apertura* sia completamente immersa nel campione e che sia a fuoco
5. Premere CAL e impostare i dati qui riportati nella schermata C1:
  - Select Units: µm

- Calibrator Size: 10  $\mu\text{m}$
  - Measure Aperture: Yes
6. Premere START. Dovrebbe apparire la schermata C4, nel caso si presentino errori fare riferimento al paragrafo *Errori in fase di calibrazione*. Lo strumento inizia a contare le particelle presenti nel campione.
  7. Al termine della misurazione, appare la schermata C3. Premere nuovamente START.
  8. Appare la schermata di calibrazione C6. Attendere che la macchina completi le varie fasi della calibrazione.
  9. Al termine dell'operazione appare la schermata C7, dove è riportato il valore di  $K_d$  calcolato dallo strumento.
  10. Per memorizzare il valore appena stimato premere START (viene sovrascritto il valore precedentemente in memoria), altrimenti, per rifiutare il valore di  $K_d$  appena calcolato, premere CAL. Per effettuare una nuova procedura di calibrazione premere nuovamente CAL e ripetere il protocollo dal punto 5.

## **Errori**

### *Errori in fase di calibrazione*

<b>ERRORE</b>	<b>SOLUZIONE</b>
CHECK METERING SYSTEM	Aggiungere diluente (pulito) al reservoir di pescaggio in quanto il livello di liquido potrebbe trovarsi al di sotto del sensore.
ABNORMAL APERTURE FLOW RATE	Premere UNBLOCK e successivamente premere START. Se ciò non dovesse essere sufficiente, controllare che l' <i>apertura</i> non sia bloccata. È possibile provare a pulire L' <i>apertura</i> spruzzando dell'acqua ultrapura sull' <i>apertura</i> . Se il problema persiste, ricorrere alla funzione FLUSH APERTURE (allontana le particelle eventualmente presenti o le bolle d'aria flussandole verso l'esterno). In casi disperati è necessario svitare l' <i>apertura</i> (spruzza via ciò che la ostruisce) e poi eseguire un nuovo riempimento del circuito dello strumento.

---

Schermata C10

Il valore di moda stimato dallo strumento non rientra nel limite industriale. Se tale valore risulta troppo alto, è necessario ridurre i valori di *Gain* e/o di *Current* precedentemente calcolati dallo strumento; se tale valore è troppo basso i valori di *Gain* e/o di *Current* devono essere aumentati. Se sono modificati tali valori, è necessario procedere con una nuova calibrazione dello strumento.

---

Schermata C11

La moda del campione supera per meno del 5% il limite industriale (21-42%). E' possibile decidere di continuare la calibrazione premendo CAL, oppure si può ripetere l'operazione di calibrazione premendo START.

---

### *Errori in fase di conta*

<b>ERRORE</b>	<b>SOLUZIONE</b>
ABNORMAL APERTURE FLOWRATE	Premere UNBLOCK e successivamente premere START. Se ciò non dovesse essere sufficiente, controllare che l' <i>apertura</i> non sia bloccata. È possibile provare a pulire L' <i>apertura</i> spruzzando dell'acqua ultrapura sull' <i>apertura</i> . Se il problema persiste, ricorrere alla funzione FLUSH APERTURE (allontana le particelle eventualmente presenti o le bolle d'aria flussandole verso l'esterno). Se ciò non dovesse funzionare è necessario svitare l' <i>apertura</i> (spruzza via ciò che la ostruisce) e poi eseguire un nuovo riempimento del circuito dello strumento.
CHECK METERING SYSTEM	Aggiungere diluente (pulito) al reservoir di pescaggio in quanto il livello di liquido potrebbe trovarsi al di sotto del sensore.

## **V. Preparazione dei reagenti per PAS assay**

*Il numero dei campioni previsti per l'esperimento è 4. I campioni devono essere nominati come segue:*

*S1-S2: campioni per la sonicazione (controllo positivo, massima stimolazione ottenuta attraverso l'utilizzo del sonicatore)*

*C1-C2: controllo negativo (piastrine non stimulate)*

*È importante stimare il numero di esperimenti previsti in una giornata.*

*Per calcolare la quantità dei reagenti necessari per gli esperimenti da condurre nel corso della giornata, è necessario moltiplicare il numero di campioni ad esperimento per il numero di esperimenti previsto (TOT).*

*N.B. La concentrazione di  $20 \times 10^3/\mu\text{l}$  è la concentrazione di piastrine che vogliamo ottenere all'interno di ciascuna falcon EXP. In questo modo si standardizza la quantità di reagenti che vengono utilizzati durante gli esperimenti al fine di poter eseguire confronti tra esperimenti diversi.*

### **REAGENTI PER TUBES**

<b>REAGENTI</b>	<b><math>20 \times 10^3/\mu\text{l}</math></b>
<b>HBS:BSA pH 7.4</b>	50 $\mu\text{l}$
<b>50mM CaCl<sub>2</sub></b>	10 $\mu\text{l}$
<b>FII + HBS:BSA-PEG</b>	10 $\mu\text{l}$

1. Predisporre un contenitore (polistirolo) con ghiaccio in cui mantenere in fresco (+4°C) i reagenti per tutta la giornata durante l'esperimento.
2. In un Eppendorf da 650 $\mu\text{l}$  preparare **FII + HBS:BSA-PEG** addizionando **12  $\mu\text{l}$  FII** (conservato in freezer a -80°C) con **48  $\mu\text{l}$  HBS:BSA-PEG** (conservato in frigo a +4°C). Pipettare ripetutamente su e giù per mescolare bene i due reagenti.
3. Nella Falcon da 15 ml denominata "TUBES" inserire:
  - **50  $\mu\text{l}$  x TOT HBS:BSA pH 7.4** (conservato in frigo a +4°C) = **200  $\mu\text{l}$  HBS:BSA** (1 exp, 4 campioni)
  - **10  $\mu\text{l}$  x TOT 50mM CaCl<sub>2</sub>** (conservato in frigo a +4°C) = **40  $\mu\text{l}$  CaCl<sub>2</sub>** (1 exp, 4 campioni)
  - **10  $\mu\text{l}$  x TOT FII + HBS:BSA-PEG** = **80  $\mu\text{l}$  FII + HBS:BSA-PEG** (1 exp, 4 campioni)
4. Conservare in ghiaccio la Falcon denominata TUBES appena preparata.

### Reagenti per i pozzetti dello spettrofotometro (WELLS)

Reagenti	20x10 <sup>3</sup> /μl
HBS:BSA + EDTA	100 μl
CH-TH	50 μl

1. In una Falcon da 15 ml denominata “**WELLS**” inserire:
  - **100 μl x TOT HBS:BSA pH 7.4 + 5 mM EDTA** (conservato in frigo a +4°C) = **400 μl HBS:BSA** (1 exp, 4 campioni)
  - **50 μl x TOT Chromozym-TH (CH-TH)** (conservato in freezer a -20°C) = **200 μl CH-TH** (1 exp, 4 campioni)
2. Conservare in ghiaccio la Falcon denominata WELLS. Prelevare la Falcon WELLS dal ghiaccio dieci minuti prima di riempire i pozzetti della micro piastra che andrà inserita nello spettrofotometro.

### Reagenti per il Fattore Xa attivato (FXa)

Reagenti	20x10 <sup>3</sup> /μl
FX	5 μl

*N.B. Questa operazione andrebbe eseguita vicino al freezer (-20°C), dove è riposto il Fattore X, in modo da minimizzare lo sbalzo termico per il Fattore X. Il Fattore X assume la sua forma attiva (FXa) quando entra in contatto con il campione piastrinico.*

1. In un Eppendorf da 650 μl inserire **117.6 μl HBS:BSA-PEG** (prelevato dal frigo +4°C) e **2.4 μl di Fattore X** (prelevato dal freezer a -20°C) e mescolarli pipettando su e giù ripetutamente. Utilizzare il *vortex* per facilitare il mescolamento.
2. Conservare la Eppendorf appena preparata contenente il FX in ghiaccio.

## 50mM CaCl<sub>2</sub>

Reagenti	20x10 <sup>3</sup> /μl
50mM CaCl <sub>2</sub>	60 μl

1. In un Eppendorf da 650 μl introdurre **60 μl** x N\_stimato\_Exp di **50 mM CaCl<sub>2</sub>** (conservato in frigo +4°C in Falcon coniche da 50 ml).
2. Mantenere la Eppendorf appena preparata contenente 50 mM CaCl<sub>2</sub> a temperatura ambiente per almeno 1h prima del suo utilizzo.

## Preparazione della soluzione da cui prelevare i campioni per ogni esperimento (Exp 1, Exp 2, ..., Exp n)

Reagenti	20x10 <sup>3</sup> /μl
PB1X	per differenza
50mM CaCl <sub>2</sub>	X × 0.60 ml
GFP	$\frac{20 \times 10^3}{\text{piastrine}/\mu\text{l}_{GFP}} \times X$
<b>Volume Totale</b>	<b>X ml</b>

1. In una provetta denominata EXP\_i inserire nell'ordine:
  - **PB1X** (X ml – volume CaCl<sub>2</sub> – volume GFP), conservato in bagno termostato a +37°C.
  - Volume di **GFP** calcolato in base alla proporzione:  
**20x10<sup>3</sup> : piastrine/μl = Vol<sub>GFP</sub> : X ml** (situato sul *orbital shaker* a T<sub>amb</sub>).
2. Riporre la Falcon Exp\_i e la Falcon GFP sull'*orbital shaker* fino all'inizio dell'esperimento.
3. Aggiungere i **60 μl** × X di **CaCl<sub>2</sub>** appena prima di prelevare i campioni di controllo negativo e i campioni da sonicare. Il CaCl<sub>2</sub> deve essere conservato a temperatura ambiente.

4. **Annotare l'ora** di preparazione (in particolare ora di aggiunta del CaCl<sub>2</sub> al GFP).
5. Riporre il PB1X nel bagno termostato (+37°C).

## **VI. Sonicazione**

*NOTA: Aggiungere i 5 µl di FXa contemporaneamente alle vials C1, C2 e S1, S2 (è importante per via del tempo di incubazione del FXa prima della misura in spettrofotometro)*

*Preparare inizialmente l'Exp\_N solamente con Platelet Buffer 1X e GFP. Il calcio va aggiunto solamente prima di iniziare la procedura di sonicazione. Prima di prelevare i 350 µl da sonicare o i 25 µl di controllo negativo, capovolgere delicatamente la falcon Exp\_N in modo tale da mescolare in maniera omogenea il contenuto.*

*Prima di preparare i campioni di controllo negativo e i campioni sonicati, assicurarsi di aver riempito i pozzetti della micropiastra che andrà inserita nello spettrofotometro con 150 µl della soluzione prelevata dalla Falcon WELLS (HBS:BSA + EDTA e CH-TH).*

### **Campioni C1 e C2 (controllo)**

1. Prendere le vial C1 e C2 e inserire in ciascuna di esse **5 µl di FXa**, assicurandosi di depositarlo sul bordo interno della vial.
2. Prelevare **25 µl** dalla Falcon denominata **Exp\_i** (GFP + PB 1X + CaCl<sub>2</sub>) e inserirli nella vial **C1** preparata in precedenza (contenente 70 µl di soluzione prelevata dalla Falcon TUBES e 5 µl di FXa).
1. Ripetere l'operazione una seconda volta e inserire i **25 µl** prelevati dalla Falcon **Exp\_i** nella vial **C2**.
2. Scuotere le due vial appena preparate dall'alto verso il basso con un movimento deciso e picchiettare il fondo delle vial in modo da mescolare il contenuto. Incubare in bagno termostato (+37°C) per **10 minuti**. Annotare l'ora.



3. Trascorsi i 10 minuti, prelevare da ciascuna vial (**C1-C2**) **10 µl** di soluzione e inserirli in due pozzetti dello spettrofotometro.

### **Campioni S1 ed S2 (da sonicare)**

1. Prendere le vial S1 e S2 e inserire in ciascuna di esse **5 µl di FX**, assicurandosi di depositarlo sul bordo interno della vial.
2. Prelevare **350 µl** dalla Falcon denominata **Exp\_i** (GFP+PB1X+CaCl<sub>2</sub>) e inserirli in una Eppendorf vuota. Ripetere l'operazione due volte (in due Eppendorf distinte) per ottenere i **due campioni S1 e S2**.
3. Posizionare la prima vial sotto la sonda del sonicatore e **sonicare** il contenuto per **10 secondi** a **7 W** (10% della potenza massima impostabile sullo strumento). Ripetere lo stesso procedimento per la seconda vial.
4. Al termine della sonicazione prelevare **25 µl** da ciascuna delle due vials contenenti i campioni sonicati e aggiungerli rispettivamente alle vial S1 ed S2 preparate in precedenza (contenenti 70 µl di soluzione prelevata dalla falcon TUBES e 5 µl di FXa).
5. Scuotere le due vial appena preparate dall'alto verso il basso con un movimento deciso e picchiettare il fondo delle vial in modo da mescolare il contenuto. Incubare in bagno termostato (+37°C) per **10 minuti**. Annotare l'ora.
6. Trascorsi i 10 minuti, prelevare da ciascuna vial (**S1-S2**) **10 µl** di soluzione e inserirli in due pozzetti dello spettrofotometro.

*N.B. Questo protocollo di sonicazione prevede di sonicare due campioni a 7 W per 10 secondi. Nel caso in cui si vogliano testare livelli diversi di sonicazione è sufficiente cambiare i parametri impostati sullo strumento.*

## VII. Spettrofotometro

*N.B. prima di caricare i pozzetti dello spettrofotometro con i campioni, assicurarsi che siano già riempiti con 150 µl della soluzione WELLS seguendo le indicazioni presenti nel primo punto del protocollo.*

### **Riempimento pozzetti dello spettrofotometro con i reagenti necessari allo svolgimento dell'esperimento**

1. Assicurarsi che lo spettrofotometro sia connesso al pc.
2. Aprire il programma SkanIt 3.1.
3. Dalla schermata *Home* premere sull'icona *Plate Out* e aspettare che il piatto dello strumento venga espulso.
4. Prendere la micropiastra da 96 pozzetti e inserirla nella sua sede.
5. Prelevare con una pipetta graduata **150 µl** della soluzione “**WELLS**” e inserirli nel pozzetto **A1**.
6. Ripetere la stessa operazione con i pozzetti **A2**, **A3** e **A4** (1 exp con 4 campioni).

### **Creazione protocollo di lettura dei campioni**

1. Aprire il programma SkanIt 3.1.
2. Dalla schermata *Home* creare un nuovo protocollo di lettura (*New*).
3. Si apre la schermata *Layout*. Cliccare sui pozzetti di interesse e denominarli premendo il tasto destro (es. A1, A2, A3 e A4). I controlli negativi sono denominati *Blanks*; i campioni sonicati possono essere denominati cliccando sulla voce *Unknowns*.
4. Passare alla schermata *Protocol*.
5. Cliccare sull'icona *Area Definition* e impostare i pozzetti che verranno letti.
6. Cliccare sull'icona *Shake* e impostare i seguenti parametri:
  - *Duration*: 5 secondi
  - *Shaking Type*: Continuous

- *Speed*: Medium
7. Cliccare sull'icona *Kinetic Loop* e impostare:
    - *Readings*: 240
    - *Interval*: 2 secondi
  8. Cliccare sull'icona *Photometric* e impostare:
    - *Measurement Mode*: Normal
    - *Filter*: 405 nm
  9. Cliccare sull'icona *Plate Out*.
  10. Il protocollo così creato viene salvato nel momento in cui si preme *Start* e si avvia la lettura dei pozzetti.

### **Analisi spettrofotometria – Misura grado di attivazione del GFP**

1. Caricare i pozzetti **A1** e **A2** con **10 µl** di soluzione prelevata rispettivamente dalle vial **C1** e **C2** (si trovano nel bagnetto termostato da 10 minuti - preparate nel Protocollo 6) e i pozzetti **A3** e **A4** con **10 µl** di soluzione prelevata rispettivamente dalle vial **S1** e **S2** (si trovano nel bagnetto termostato da 10 minuti - preparate nel Protocollo VI)
2. Dalla schermata *Protocol* premere *Start* per avviare la lettura dei pozzetti.

*N.B. Il protocollo che viene avviato consente allo spettrofotometro di eseguire ogni 2 secondi una lettura per ciascuno dei pozzetti. Ogni pozzetto viene letto per 8 minuti.*

## **VIII. Pulizia dei *beads* e della colonna**

*Questo protocollo va eseguito ogni 2 settimane.*

*I beads devono essere sostituiti una volta l'anno.*

### **Svuotamento della colonna e raccolta dei *beads***

1. Prendere un becher di plastica graduato da 500ml, lavarlo con dH<sub>2</sub>O e collocarlo al di sotto della colonna.
2. Mantenendo avvitato il tappo superiore della colonna, rimuovere il tappo inferiore e lasciare scendere i *beads* nel becher. Svitare il tappo superiore per facilitare la caduta del gel.
3. Sciacquare il tappo inferiore con la spruzzetta di acqua ultrapura in modo da recuperare i *beads* residui.
4. Sciacquare l'interno della colonna con acqua ultrapura per recuperare i *beads* rimasti all'interno.
5. Annotare il volume di *beads* raccolto nel becher e calcolare la quantità di SDS 20% necessaria per raggiungere una concentrazione finale di SDS pari a 0.5%:

$$\text{Volume\_Beads} : \text{Volume di 20\% SDS} = 20 : 0.5$$

6. Pipettare la quantità di SDS 20% calcolata al punto 5 all'interno del becher contenente i *beads*.
7. Aggiungere la quantità di NaOH 10 M necessaria per raggiungere una concentrazione finale pari a NaOH 50 mM:

*NB: nella proporzione considerare il volume iniziale di gel, ossia prima dell'aggiunta del SDS.*

$$\text{Volume\_Beads} : \text{Volume di NaOH 10 M} = 10 \text{ M} : 50 \text{ mM}$$

8. Mescolare il tutto con la spatola (per torte, ndr) in **Teflon**. Coprire il becher con pellicola trasparente, lasciando la spatola all'interno. Posizionare il becher sull'*orbital shaker*
9. Continuare a mescolare ogni 10 min per 1h.

*N.B: Non usare l'agitatore magnetico: l'azione del magnete potrebbe danneggiare i beads*

N.B: *Mescolare delicatamente i beads con la spatola (sono molto fragili).*

### **Lavaggio della colonna**

1. Pulire la colonna con Candeggina 10% (sia dentro che fuori) e risciacquare abbondantemente con acqua ultrapura. Lasciare asciugare.
2. Rimuovere la **mesh** dal tappo inferiore della colonna e immergerla in un becher contenente **0.5% SDS + 50 mM NaOH**. Coprire il becher con pellicola trasparente e posizionarlo nel bagno termostato a **37° per 30-60 min**.
3. Avvolgere due tappi in gomma con pellicola trasparente e tappare un'estremità della colonna asciutta (press-fit).
4. Versare circa **3ml di Sigmacote** all'interno della colonna e tappare l'altra estremità. Agitare, eseguendo un movimento rotatorio in modo tale che l'intera superficie interna della colonna sia bagnata dal Sigmacote.
5. Svuotare la colonna dal Sigmacote in eccesso ed appendere la colonna al supporto per lasciare evaporare il Sigmacote residuo.
6. **Lavare i tappi** della colonna con 0.5% SDS e acqua ultrapura.
7. Estrarre la *mesh* dal bagno termostato, lavarla delicatamente con la spruzzetta di acqua ultrapura. Riposizionare delicatamente la mesh nel tappo inferiore della colonna assicurandosi che sia ben adesa.
8. Avvitare il tappo inferiore della colonna verificando che sia ben serrato. Assicurarsi della tenuta versando circa 20 ml di acqua ultrapura nella colonna e verificare che non ci siano perdite.

### **Lavaggio dei beads e riempimento della colonna**

*Nota: lavorare in prossimità della pompa a vuoto*

1. Prendere la *Flask da 4l con beccuccio laterale* e posizionare al di sopra di essa l'imbutto Buchner con setto filtrante utilizzando i 3 collari in gomma per garantire la tenuta tra i due elementi.

2. Riempire il becher da 4l con acqua distillata.
3. Versare i *beads* da lavare nell'imbuto Buchner, facendo attenzione a recuperare i *beads* residui con la spruzzetta di acqua ultrapura (ed eventualmente la spatola).
4. Versare acqua distillata dal becher da 4l fino a riempire interamente l'imbuto Buchner. Mescolare delicamente con la spatola in silicone per far risalire i *beads* sedimentati. Recuperare con la spruzzetta di acqua ultrapura i *beads* adesi alla spatola.
5. Collegare il tubo della pompa a vuoto al beccuccio laterale della Flask da 4l e accendere la pompa. Aspirare fino a che il livello dell' acqua distillata nell'imbuto abbia raggiunto quello dei *beads* (*Attenzione a non farli mai asciugare!*).

*Nota: potrebbe fare molte bolle soprattutto all'inizio, tutto sotto controllo!!!*

6. Rimuovere il tubo dal beccuccio laterale prima di spegnere la pompa.
7. Ripetere dal punto 4 al punto 6 almeno fino ad aver esaurito i 4l di acqua distillata (affinché tutto il sapone venga risciacquato, bisognerebbe fermarsi quando nel fluido filtrato non si vedono più bolle-schiuma).
8. Eseguire **l'ultimo lavaggio dei beads con acqua ultrapura**.
9. Al termine dell'ultimo lavaggio, preparare una Flask con beccuccio laterale da 500 ml posizionare al di sopra di essa un imbuto e versare i *beads*. Recuperare tutti i *beads*, anche quelli che restano adesi all'imbuto con la spruzzetta di acqua ultrapura.
10. Aggiungere **1 ml di Sodio Azide 5% per ogni 100 ml di beads** usando una pipetta.
11. Tappare la Flask con un tappo di gomma e posizionarla nel bagno termostato a 37° per almeno 20 minuti.

*Nota: tieni i beads al caldo il più possibile in modo da favorirne successivamente il travaso in colonna.*

12. Lavare più volte tutto quello che è stato a contatto con i *beads* (imbuti, Flasks, spatola) con acqua distillata.
13. Al termine dei 20 minuti prelevare la Flask dal bagno termostato, collegare il beccuccio laterale alla pompa a vuoto e degasare. Attivare la pompa e agitare leggermente la flask per favorire il degasamento. Fermare il tutto quando si iniziano a vedere le bolle (dopo pochi secondi).
14. Versare i *beads* nella colonna (facendoli correre lungo la parete). Recuperare i *beads* rimasti nella Flask aiutandosi con la spruzzetta di acqua ultrapura.
15. Lasciar sedimentare i *beads* nella colonna mantenendo appoggiato il tappo superiore (senza avvitarlo ed evitando che il tubicino tocchi il gel).
16. Aggiungere Sodio Azide 0.05% in superficie (con una pipetta facendolo correre lungo la parete o con una siringa attraverso il rubinetto tre vie collegato al tubicino di inflow) qualora i *beads* dovessero “seccarsi”.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P, Rayner M (2012), *European Cardiovascular Disease Statistics 2012*. European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis
- [2] Christiansen S, Klocke A, and Autschbach R (2008), *Past, Present, and Future of Long-term Mechanical Cardiac Support in Adults*. J Card Surg 23 (6): 664-676.
- [3] Rothenburger M, Wilhelm MJ, Hammel D, Schmidt C, Tjan TDT, Böcker D, Scheld HH and Schmidt C (2002), *Treatment of Thrombus Formation Associated With the MicroMed DeBakey VAD Using Recombinant Tissue Plasminogen Activator*. Circulation 106 (1): 189-192.
- [4] Goldstein DJ, Oz MC and Rose EA (1998), *Implantable Left Ventricular Assist Devices*. The New England Journal of Medicine 339 (21): 1522-1533.
- [5] Himmelreich G, Ullmann H, Riess H, Rosch H, Loebe M, Schiessler A and Hetzer R (1995). *Pathophysiologic Role of Contact Activation in Bleeding Followed by Thromboembolic Complications After Implantation of a Ventricular Assist Device*. ASAIO J. 41 (3): 790-794.
- [6] Kidane AG, Burriesci G, Cornejo P, Dooley A, Sarkar S, Bonhoeffer P, Edirisinghe M and Seifalian AM (2009), *Current Developments and Future Prospects for Heart Valve Replacement Therapy*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 88 (1): 290-303.
- [7] Massel D, Little SH (2001), *Risks and Benefits of Adding Anti-platelet Therapy to Warfarin among Patients with Prosthetic Heart Valves: a Meta-analysis*. J Am Coll Cardiol 37 (2): 569-578
- [8] Butchart EG, Ionescu A, Payne N, Giddings J, Grunkemeier GL, and Fraser AG (2003), *A New Scoring System to Determine Thromboembolic Risk After Heart Valve Replacement*. Circulation 108 (1): 1168-1174.



- [9] Hellums JD (1994), *1993 Whitaker Lecture: biorheology in thrombosis research*. Ann Biomed Eng 22 (5): 445-455.
- [10] Zimmermann AK, Weber N, Aebert H, Ziemer G and Wendel HP (2007), *Effect of Biopassive and Bioactive Surface-coatings on the Hemocompatibility of Membrane Oxygenators*. Journal of Biomedical Materials Research Part B 80 (2): 433-439.
- [11] Bluestein D (2004), *Research Approaches for Studying Flow-induced Thromboembolic Complications in Blood Recirculating Devices*. Expert Review of Medical Devices 1 (1): 65-80.
- [12] Song X, Throckmorton AL, Wood HG, Antak JF and Olsen DB (2004), *Quantitative Evaluation of Blood Damage in a Centrifugal VAD by Computational Fluid Dynamics*. J. Fluids Eng 126 (3): 410-418.
- [13] Schaadt J (1999), *Oxygenator thrombosis: an international phenomenon*. Perfusion 14 (6): 425-435.
- [14] A.D. Michelson, *Platelets*. 2002, Academic Press: San Diego, CA.
- [15] Cimmino G, Golino P (2013), *Platelet Biology and Receptors Pathways*. J. of Cardiovasc. Trans. Res. 6: 299-309.
- [16] Andrews RK, Berndt MC (2004), *Platelet Physiology and Thrombosis*. Thrombosis Research 114: 447-453.
- [17] Jurk K, and Kehrel BE (2005), *Platelets: Physiology and Biochemistry*. Semin Thromb Hemost 31 (4): 381-392.
- [18] Woulfe DS, Yang J, Prevost N, O'Brien PJ, and Brass LF (2002), *Signal Transduction During the Initiation, Extension, and Perpetuation of Platelet Plug Formation*, in *Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2002, Academic Press: San Diego, CA.: 197-213.
- [19] Tracy PB, Eide LL, and Mann KG (1985), *Human Prothrombinase Complex Assembly and Function on Isolated Peripheral Blood Cell Populations*. J Biol Chem 260 (4): 2119-2124.

- [20] Bouchard BA, Butenas S, Mann KG, and Tracy PB (2002), *Interaction Between Platelets and the Coagulation System*, in *Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2002, Academic Press: San Diego, CA: 229-253.
- [21] Sorens EN, Burgreen GW, Wagner WR, Antaki JF (1999), *Computational simulation of platelet deposition and activation: I. Model development and properties*. *Ann Biomed Eng* 27 (4): 436-448.
- [22] Nobili M, Sheriff J, Morbiducci U, Redaelli A and Bluestein D (2008), *Platelet Activation due to hemodynamic shear stresses: damage accumulation model and comparison to in vitro measurement*. *ASAIO J.* 54 (1): 64-72.
- [23] Sheriff J, Bluestein D, Girdhar G and Jesty J (2010), *High-Shear Stress Sensitizes Platelet to Subsequent Low-Shear Conditions*. *Ann Biomed Eng* 38 (4): 1442-1450.
- [24] Girdhar G, Xenos M, Alemu M, Chiu WC, Lynch BE, Jesty J, Einav S, Slepian MJ, and Bluestein D (2012), *Device Thrombogenicity Emulation: A Novel Method for Optimizing Mechanical Circulatory Support device Thromboresistance*. *PLoS One* 7 (3): e32463.
- [25] Bluestein D (2006), *Toward optimization of the thrombogenic potential of blood recirculating cardiovascular devices using modeling approach*. *Expert Rev Med Devic* 3 (3): 267-270.
- [26] Bluestein D, Yin W, Affeld K, Jesty J (2004), *Flow-Induced Platelet Activation in Mechanical Heart Valves*. *Annals of Biomedical Engineering* 32 (8): 1058-1066.
- [27] Alemu Y and Bluestein D (2007), *Flow-Induced Platelet Activation in Mechanical Heart Valves: Numerical Studies*. *Artificial Organs* 31 (9): 677-688.
- [28] Dalla Valle F, *Studio dell'aggregazione piastrinica con aggregometro ad elettrodi multipli (Multiplate®) e della disfunzione endoteliale con tecnica ecocolordoppler in soggetti trombofilici*. Tesi di dottorato, Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari, 2013

- [29] Brown CH, Leverett LB, Lewis W, Alfrey CP and Hellums JD (1975), *Morphological, biochemical and functional changes in human platelets subjected to shear stress*. J. Lab. Med. 86: 462-471
- [30] Brown CH, Lemuth RF, Hellums JD, Leverett LB and Alfrey CP (1975), *Response of human platelets to shear stress*. Trans. Am. Soc. Artif. Int. Org. 21: 35-39.
- [31] Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI and Moake JL (1996), *Platelet and Shear Stress*. Blood 88(5):1535-1541.
- [32] Wurzinger LJ, Opitz R, Blasberg P and Schmid-Schonbein H (1985), *Platelet and coagulation parameter following millisecond exposure to laminar shear stress*. Thromb Haemost 54(2): 381-386
- [33] Zhang JN, Bergeron AL, Yu Q, Sun C, McIntire LV, Lopez JA and Dong JF (2002), *Platelet aggregation and activation under complex patterns of shear stress*. Thromb Haemost 88 (5): 817-821.
- [34] Giorgio TD and Hellums D (1988), *A cone and plate viscometer for the continuous measurement of blood platelet activation*. Biorheology 25: 605-624.
- [35] Johnston GG, Marzec U and Berstein F (1975), *Effect of surface injury and shear stress on platelet aggregation and serotonin release*. Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs 21: 413-421.
- [36] Michelson AD (1996), *Flow Cytometry: A Clinical Test of Platelet Function*. Blood 87 (12): 4925-4936.
- [37] Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ and Shatti SJ (1990), *Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans*. Blood 75 (1): 128-138.
- [38] Westerweel J (1997), *Fundamental of digital particle image velocimetry*. Meas. Sci. Technol. 8: 1379-1392.
- [39] Raz S, Einav S, Alemu Y and Bluestein D (2007), *DPIV Prediction of Flow Induced Platelet Activation-Comparison to Numerical Predictions*. Ann Biomed Eng 35 (4): 493-504.

- [40] Ramstack JM, Zuckerman L, Mockros LF (1979), *Shear-induced activation of platelet*. J Biomech 12 (2): 113-125.
- [41] Boreda R, Fatemi RS, Rittgers SE (1995), *Potential for platelet stimulation in critically stenosed carotid and coronary arteries*. J Vasc Investig 1: 26-37
- [42] Grigioni M, Morbiducci U, D'Avenio G, Benedetto GD, Gaudio CD (2005), *A novel formulation for blood trauma prediction by a modified power-law mathematical model*. Biomech Model Mechanobiol 4 (4): 249-260.
- [43] Pelosi A, Sheriff J, Stevanella M, Fiore GB, Bluestein D and Redaelli A (2014), *Computational Evaluation of the Thrombogenic Potential of a Hollow-Fiber Oxygenator with Integrated Heat Exchanger during Extracorporeal Circulation*. Biomech Model Mechanobiol, Volume 13 (2): 349-361.
- [44] Bluestein D, Einav S, Slepian MJ (2013), *Device Thrombogenicity Emulation: A Novel Methodology for Optimizing the Thromboresistance of Cardiovascular Devices*. Journal of biomechanics 46: 338-344.
- [45] Xenos M, Girdhar G, Alemu Y, Jesty J, Slepian M, Einav S, Bluestein D (2010), *Device Thrombogenicity Emulator (DTE) – Design Optimization Methodology for Cardiovascular Devices: A Study in two Bileaflet MHV Design*. J Biomech 43 (12): 2400-2409.
- [46] Grigioni M, Morbiducci U, D'Avenio G (2005), *A Novel Formulation for Blood Trauma Prediction by a Modified power-Law Mathematical Model*. Biomech Model Mechanobiol 4: 249-260.
- [47] Jesty J and Bluestein D (1999), *Acetylated Prothrombin as a Substrate in the Measurement of the Procoagulant Activity of Platelets: Elimination of the Feedback Activation of Platelets by Thrombin*. Analytical Biochemistry 272: 64-70.

[48] Pelosi A , Final Dissertation: *Design Optimization and Thrombogenicity Evaluation of Blood Recirculating Devices for Cardiopulmonary Bypass*. Tesi di dottorato, Politecnico di Milano, Dipartimento di Bioingegneria, 2013.

[49] Girdhar G, Bluestein D (2008), *Biological Effects of Dynamic Shear Stress in Cardiovascular Pathologies and Devices*. *Expert Rev Med Devic* 5 (2): 167-181.

[50] Blackman BR, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA, Jr. (2002), *A New in Vitro Model to Evaluate Differential Responses of Endothelial Cells to Simulated Arterial Shear Stress Waveforms*. *J Biomech Eng* 124 (4): 397-407.

[51] Jesty J, Yin W, Perrotta P, Bluestein D (2003), *Platelet Activation in a Circulating Flow Loop: Combined Effects of Shear Stress and Exposure Time*. *Platelets* 14 (3): 143-149.

[52] Assay Sheet Cromozym-TH, Roche.

[53] Alemu Y, Girdhar G, Xenos M, Sheriff J, Jesty J, Einav S, Bluestein D (2010), *Design Optimization of a Mechanical Heart Valve for Reducing Valve Thrombogenicity – A Case Study with ATS Valve*. *ASAIO J* 56 (5): 389-396.

[54] Kids D100 Oxygenator Brochure: <http://www.sorin.com/product/kids-d100>

## RINGRAZIAMENTI

Con il presente elaborato si conclude un periodo importante della nostra vita. In questo anno appena concluso abbiamo avuto modo di crescere e di confrontarci con una realtà lavorativa che non conoscevamo, abbiamo portato a termine un percorso iniziato quasi sei anni fa e, se non fosse stato per tutte le persone che ci sono state accanto e che ci hanno aiutato in ogni singola fase di questo progetto, non sappiamo come avremmo potuto arrivare a scrivere queste pagine.

Vorremmo ringraziare in primis il Professore Alberto Redaelli, nostro relatore, che ci ha permesso di iniziare questa esperienza proponendoci di lavorare sul progetto alla base della nostra Tesi, consigliandoci e fornendo il suo aiuto in tutte le fasi sperimentali del progetto.

Un ringraziamento al Professore Gianfranco Fiore, che ci ha offerto il suo aiuto nello svolgimento del lavoro sperimentale mettendo a nostra disposizione tutti i materiali, i reagenti e gli strumenti presenti all'interno del  $\mu$ BSLab e all'interno del ThLab.

Un grazie speciale va al nostro tutor, Filippo Consolo, che ci ha seguiti durante tutto il nostro lavoro, cercando di indirizzarci sempre verso la strada giusta e che ha cercato, con pazienza e tenacia, di passarci un metodo di lavoro da applicare in tutte le fasi della nostra futura vita lavorativa.

Vorremmo ringraziare Lorenzo Valerio per il supporto e l'aiuto fornitoci durante quest'anno, che, grazie alla sua esperienza in laboratorio, ci ha aiutato a prendere dimestichezza con il PAS *assay*.

Grazie ai veterinari (Dott. Brizzola, Dott. Borghi) e ai macellai (Pozzi Mario e Buzzi Paolo) che ci hanno fornito il sangue per realizzare gli esperimenti alla base del nostro lavoro.

Un grazie anche tutti i ragazzi e i dottorandi che lavorano all'interno del  $\mu$ BSLab e del ThLab che sono riusciti a strapparci un sorriso anche nei momenti di sconforto.

Grazie ad Alessandra e Michela, tesiste come noi, che hanno condiviso i pranzi, le risate e i momenti no per tutta la durata del nostro progetto.

Vorremmo ringraziare tutti coloro (mamma e papà, Marco, Maurizio, i nostri amici) che ci hanno supportate e sopportate nel corso di quest'ultimo anno. Grazie per averci detto di tenere duro in ogni momento e per aver sempre creduto in noi, anche quando eravamo le prime a non avere fiducia in noi stesse.