



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE
CORSO DI LAUREA IN BIOINGEGNERIA

**UN NUOVO MODELLO CONCETTUALE PER LA PREVISIONE
DELL'EMOLISI IN PRESENZA DI DISPOSITIVI BIOMEDICI
CARDIOVASCOLARI: IL RUPTURE MODEL**

Laureando: MATTEO VILLA

Relatore: Prof.ssa FRANCESCA MARIA SUSIN

Correlatore: Ing. RICCARDO TONINATO

Correlatore: Prof. GIUSEPPE FADDA

13 ottobre 2014

Anno Accademico 2013/2014

ai miei genitori

Indice

Introduzione	9
1 – Gli impianti cardiovascolari e la loro impronta emolitica	13
1.1 – Emolisi indotta.....	13
1.2 – Le valvole cardiache.....	14
1.2.1 – Valutazione clinica delle performance di una valvola cardiaca	16
1.2.2 – Protesi valvolari e trend tecnologico	17
1.2.3 – Flusso attraverso una BMHV.....	19
1.3 – Red Blood Cells (RBCs)	20
1.3.1 – Geometria cellulare.....	21
1.3.2 – Eritropoiesi	22
1.3.3 – Funzione delle RBCs	23
1.3.4 – Struttura dell'emoglobina	24
1.3.5 – Funzioni secondarie delle RBCs.....	25
1.3.6 – Membrana cellulare	25
1.3.7 – Patologie.....	28
2 – Gli indici emolitici HI (Hemolysis Index)	31
2.1 – Approccio ingegneristico alla stima di un indice emolitico	32
2.1.1 – Leggi <i>all or none</i>	34
2.1.2 – Leggi di potenza (<i>power laws</i>).....	34
2.1.3 – Leggi <i>strain-based</i>	35

2.2 – Il problema della storia di carico.....	36
2.2.1 – Il modello con <i>dose</i> di Grigioni.....	38
3 – Modello meccanico di membrana	41
3.1 – Modelli autorevoli presenti in letteratura	43
3.1.1 – Modello viscoelastico Kelvin-Voigt (Evans e Hochmuth).....	43
3.1.2 – Modello iperelastico neo-Hook con aggiunta di una componente viscosa e della resistenza al piegamento (Bagchi e Zhang).....	45
3.1.3 – Modello iperelastico di membrana (Skalak)	47
4 – Limiti delle power law: un nuovo modello matematico per valutare l'emolisi.....	51
4.1 – Limiti dell'approccio power law	54
4.1.1 – Importanza della componente spaziale mediante approccio sperimentale e numerico integrato	55
4.2 – Il Rupture Model	59
4.2.1 – Campo di flusso bidimensionale	60
4.2.2 – Modello geometrico per la singola RBC	60
4.2.3 – Modello meccanico di membrana	64
4.2.4 – Criterio di rottura	66
4.2.5 – Stima dell'indice emolitico HI all'interno del Rupture Model	67
4.2.6 – Evidenze dal modello	69
5 – Implementazioni future del modello	77
5.1 – Il ruolo dell'aptoglobina	77
5.1.1 – Calcolo di alcuni parametri legati all'aptoglobina	81
5.1.2 – Prima stima del parametro Hb_{Hp}	82

5.2 – Altri aspetti biologici legati all'emolisi	83
Conclusioni	87
Bibliografia	89
Ringraziamenti	93

0

Introduzione

Negli ultimi trent'anni la chirurgia cardiovascolare ha visto un crescente interesse nell'utilizzo di numerosi tipi di device in grado di risolvere problemi anche gravi dovuti a malattie croniche o eventi acuti al sistema cardiocircolatorio. Questo sviluppo, se da una parte ha favorito la messa a punto di device sempre più performanti, ha anche sottolineato come un innesto artificiale non esprima mai la perfetta biocompatibilità con il sistema biologico in cui si trova. In particolare, questo lavoro di tesi affronta il problema emolitico legato agli impianti protesici cardiovascolari per una valvola aortica meccanica bileaflet, ma l'approccio è facilmente generalizzabile ad altri tipi di protesi. Questo tema è sicuramente uno dei più dibattuti nel settore clinico ed ingegneristico, nonché di primaria importanza nella pratica clinica pre e post operatoria. I modelli predittivi di danno fino ad ora realizzati in ambito ingegneristico, si riferiscono fondamentalmente al danno subito dai globuli rossi del sangue (Red Blood Cells, RBCs) e cercano di fornire informazioni importanti sull'entità dell'emolisi utili alla progettazione dei dispositivi o alle migliori terapie post operatorie (si pensi alla dose di anticoagulanti dopo l'innesto di una valvola meccanica). Il loro corretto utilizzo e la loro implementazione sono quindi pensati per fornire una guida chiara e razionale volta al miglioramento della sicurezza e dell'efficacia del device.

I modelli principalmente utilizzati in letteratura (Power Law) non sono ancora in grado di descrivere in maniera corretta ed esaustiva il fenomeno emolitico per una protesi nella sua totalità, prescindendo per loro natura da basi fisiche per descrivere il problema ed assumendo delle caratteristiche non fisiologiche come condizioni fluidodinamiche al contorno. Tali semplificazioni non sembrano così banali da poter essere trascurate; da questa osservazione è nata l'idea del Rupture Model e di questo lavoro di tesi ad essa collegato. Il Rupture Model è un modello meccanico di comportamento e di danno per la predizione dell'emolisi della parte corpuscolata del sangue, sviluppato all'interno del Laboratorio di Fluidodinamica Cardiovascolare del Dipartimento ICEA dell'Università degli Studi di Padova.

Tale modello vuole porsi in alternativa alle esistenti leggi di emolisi, avvicinandosi alla fisica reale del processo di danno, ed ottenendo una descrizione accurata del processo emolitico, sia dal punto di vista meccanico che biologico.

Il modello prevede una descrizione geometrica ben definita per la singola RBC (ellissoidale) nonché una formulazione meccanica adeguata per la membrana. In particolare, si è scelta una legge costitutiva iperelastica (modello di Skalak) con aggiunta di un contributo viscoso. Utilizzando un approccio sperimentale e numerico integrato è stato possibile stimare la quantità di emoglobina rilasciata dalle RBCs danneggiate, ed utilizzarla per calcolare la variazione di emoglobina libera, legandola dunque all'indice emolitico HI.

In questo lavoro di tesi sono state seguite tutte le fasi che hanno portato questo nuovo approccio per la previsione dell'emolisi ad una sua prima formulazione, studiando e quantificando tutti i fenomeni che concorrono ad aumentare il rischio emolitico.

Nel primo capitolo viene anzitutto inquadrato il problema emolitico dovuto alla presenza di un device protesico cardiovascolare: si passa dalla descrizione della valvola meccanica di tipo bileaflet, da cui viene modificato il flusso utilizzato nella nostra indagine, fino alla descrizione delle funzioni e della struttura dell'eritrocita con particolare attenzione alla composizione e alle proprietà della sua membrana.

Nel secondo capitolo viene illustrato il significato dell'indice emolitico (HI): si descrive come avviene la valutazione clinica e l'entità dell'emolisi in atto, confrontandola poi con la stima ingegneristica di un HI a partire da dati sperimentali. Infine vengono elencati e descritti gli approcci accreditati in letteratura per la stima dell'indice emolitico: le leggi all or none, le power laws, le leggi strain-based e il modello con dose meccanica.

Nel terzo capitolo vengono illustrate le proprietà della membrana dell'eritrocita che si vogliono andare a modellare: il suo comportamento iperelastico in relazione a grandi deformazioni e la sua componente viscoelastica. Vengono quindi descritti i modelli meccanici maggiormente accreditati in letteratura riportando i valori dei loro parametri costitutivi.

Il quarto capitolo è dedicato alla descrizione del Rupture Model e al commento dei risultati ottenuti dalla sua applicazione: vengono illustrati i motivi che hanno portato all'idea di un nuovo modello per la stima di HI, evidenziando i limiti informativi dell'approccio power law mediante risultati ottenuti con simulazioni numeriche. La parte centrale del capitolo si dedica alla descrizione della struttura del modello, riportando gli step fondamentali che hanno portato a

questa sua prima formulazione. Infine vengono commentate le evidenze sperimentali segnalando alcuni aspetti da approfondire per affinare il modello.

Al termine sono riportate alcune conclusioni: riassunta la formulazione per il Rupture Model si sono descritte le principali implementazioni future nel modello, con particolare attenzione al ruolo dell'aptoglobina. Per quest'ultima viene proposta una sua prima possibile parametrizzazione all'interno del modello.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato dunque quello di fornire una descrizione degli aspetti progettuali unita all'osservazione delle evidenze sperimentali che rendono il Rupture Model un modello innovativo nel panorama delle leggi di predizione per protesi cardiovascolari, più vicino alla realtà fisica e fisiologica del processo di danno subito dalle RBCs.

1

Gli impianti cardiovascolari e la loro impronta emolitica

Si introducono nel seguente capitolo alcuni dei protagonisti di questo lavoro. Nel primo paragrafo viene fatto un inquadramento del problema emolitico legato all'impianto di device protesici cardiovascolari. Nel secondo paragrafo vengono illustrate nel dettaglio le valvole cardiache. Nel terzo paragrafo vengono descritte la struttura degli eritrociti e le loro funzioni.

1.1 – EMOLISI INDOTTA

Gli impianti protesici cardiovascolari, come valvole cardiache meccaniche, VAD (Ventricular Assist Device) e TAH-t (temporary Total Artificial Heart), sono una soluzione ancora importante nel panorama delle protesi cardiache: o per la loro durabilità ed affidabilità nel tempo, o per l'assenza di effettive protesi biologiche migliorative.

In particolare, le valvole cardiache meccaniche vengono usate da più di 50 anni per sostituire le valvole del cuore, che non riescono più a svolgere correttamente la loro funzione in seguito a stenosi o insufficienza valvolare.

Se a livello meccanico e di durabilità soddisfano le esigenze, dall'altro modificano le condizioni di flusso ematico localmente: all'interno del torrente circolatorio la componente corpuscolare del sangue, come le piastrine (PLs) e gli eritrociti (RBCs), viene sottoposta localmente a sforzi ragguardevoli rispetto al fisiologico, dando luogo al ben conosciuto problema del danno e conseguente rottura cellulare.

Il danno agli eritrociti viene clinicamente tradotto nel generico termine: emolisi, dal quale derivano diverse e molteplici problematiche. La principale è sicuramente la fuoriuscita dal citoplasma cellulare dell'emoglobina (*Hb*), che libera nel sangue oltre una certa soglia ha effetti tossici per l'organismo, primo fra tutti l'ossidazione delle altre cellule.

Vi sono poi altre conseguenze da non sottovalutare: i frammenti di eritrociti liberi nel sangue possono aggregarsi portando alla formazione di trombi in grado di viaggiare liberamente nel sistema circolatorio, trasformando il problema da locale a globale (ischemie). Inoltre, la liberazione di alcuni fattori di coagulazione da parte degli eritrociti e le elevate tensioni tangenziali possono attivare il richiamo piastrinico con evidente pericolo di trombosi locale.

Per questi motivi si rende necessario studiare le sollecitazioni non naturali a cui vengono sottoposti i diversi corpuscoli del sangue, come gli eritrociti. La letteratura sull'argomento, benché vasta, manca ancora di una visione generale e fisicamente basata che permetta di cogliere le dinamiche fondamentali del fenomeno senza tralasciare aspetti biologici fondamentali. Il fine di questo lavoro è quantificare tutti i fenomeni che concorrono ad aumentare il rischio emolitico nel soggetto stimandoli in un indice di riferimento, ovvero un indice emolitico (HI, Hemolysis Index), servendosi di una formulazione innovativa per quanto riguarda la definizione del modello di danno alle RBCs.

1.2 – LE VALVOLE CARDIACHE

Nella nostra indagine, indirizzata alle specifiche valvole cardiache meccaniche nella panoramica protesica generale, il cuore sinistro e la valvola aortica sono sicuramente i soggetti principali di cui si riportano alcune basilari informazioni.

Il cuore è l'organo che pompa il sangue in tutto il corpo, le sue contrazioni sono regolate da impulsi elettrochimici generati dalle cellule pacemaker, che assicurano un ritmo sincronizzato di tutti i muscoli cardiaci.

Le valvole cardiache sono la componente chiave di questo meccanismo: sono strutture passive che regolano il flusso del sangue all'interno del cuore. Biologicamente si tratta di appendici di tessuto essenzialmente fibroso (filamenti di elastina e collagene orientati in matrici), rivestito da endocardio, che permettono il passaggio alternato del sangue attraverso gli orifizi che collegano gli atri con i ventricoli ed i ventricoli con l'aorta o l'arteria polmonare. Le valvole cardiache sono quattro e sono facilmente riconoscibili in figura 1.1, sono la:

- valvola tricuspide tra atrio e ventricolo destro;
- valvola bicuspidale o mitrale tra atrio e ventricolo sinistro;

- valvola aortica con tre cuspidi semilunari;
- valvola polmonare con tre cuspidi semilunari.

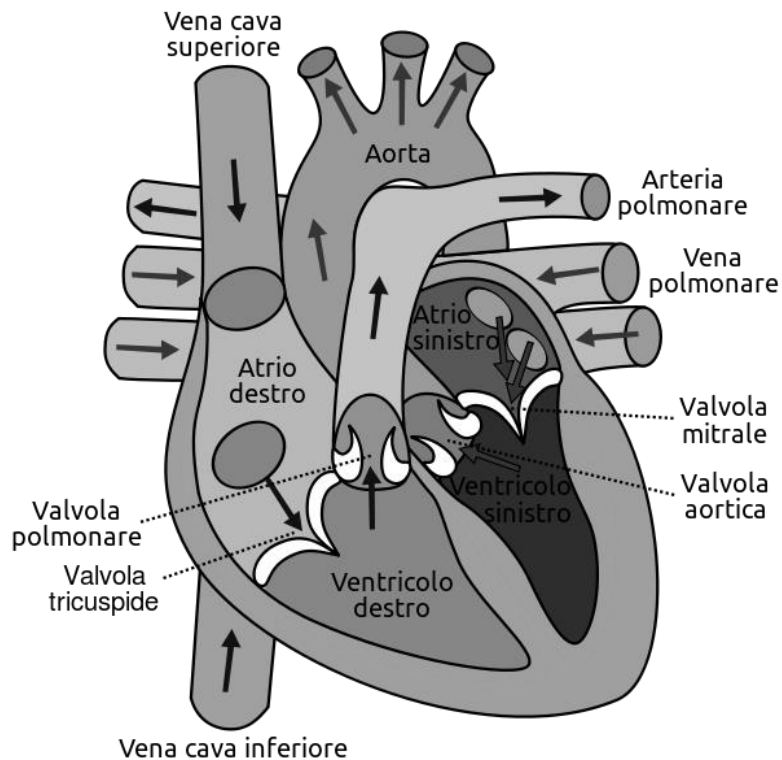


Figura 1.1. Vista frontale di un cuore umano sezionato nel piano coronale. Si osservano le 4 diverse valvole cardiache: la valvola tricuspide e la valvola mitrale tra atrio e ventricolo rispettivamente destri e sinistri; la valvola polmonare tra ventricolo destro e arteria polmonare; la valvola aortica tra ventricolo sinistro e aorta.

Esse permettono il passaggio del torrente ematico da una camera all'altra in una sola direzione, aprendosi e richiudendosi a intervalli; impediscono, quindi, il riflusso non fisiologico del sangue dai ventricoli verso gli atri durante la fase sistolica ventricolare o dalle arterie verso i ventricoli durante la fase diastolica ventricolare.

L'apertura e la chiusura delle valvole è interamente legata alle variazioni pressorie intracardiache. Non esiste infatti alcun tipo di controllo nervoso o muscolare sull'attività di queste, che sono dunque semplicemente spinte dal flusso stesso del sangue.

Le valvole cardiache sono spesso soggette a varie patologie, congenite o acquisite, che possono ridurre l'efficienza. Tra le principali ricordiamo la stenosi e l'insufficienza valvolare, prime indiziate nel caso di sostituzione valvolare.

1.2.1 – Valutazione clinica delle performance di una valvola cardiaca

Una valvola cardiaca può non adempiere efficacemente alla sua funzione per diversi motivi, che riguardano soprattutto il restringimento dell'orifizio attraverso il quale fluisce il sangue, stenosi valvolare, o una non completa chiusura dei lembi dopo il passaggio del torrente ematico, rigurgito valvolare.

Clinicamente un parametro fondamentale per la valutazione della severità nella **stenosi valvolare** è l'area del getto nella sezione di vena contratta denominata EOA, Effective Orifice Area [1].

Per il calcolo di EOA ci si può avvalere della **Formula di Gorlin** che utilizza la portata Q in (ml/s) ed il massimo salto di pressione transvalvolare $\Delta(p/\gamma)_{max}$ in (mmHg) misurati mediante catetere:

$$EOA = \frac{1}{50} \frac{Q}{\sqrt{\Delta(p/\gamma)_{max}}}$$

Tale indice viene presentato in cm^2 ed il suo valore corrisponde all'area di vena contratta nella fase di eiezione (forward flow phase).

L'ACC-AHA (American College of Cardiology - American Heart Association) ha fornito dei valori di riferimento dell'EOA per stimare la stenosi di una valvola aortica:

- Stenosi lieve per: $EOA > 1.5 \text{ cm}^2$
- Stenosi moderata per: $1 \text{ cm}^2 < EOA < 1.5 \text{ cm}^2$
- Stenosi severa per: $EOA < 1 \text{ cm}^2$

L'indagine mediante catetere, nonostante la sua invasività, è preferibile rispetto al metodo basato su eco-Doppler, il quale fornisce valori di EOA minori rispetto alla formulazione di Gorlin, rischiando di sovrastimare la severità stenotica.

Per valutare la gravità dell'**insufficienza valvolare** vengono osservati diversi parametri, tra cui il volume di rigurgito V_r (valori forniti sempre dall'ACC-AHA):

- Rigurgito lieve per: $V_r < 30$ ml/battito
- Rigurgito moderato per: $30 \text{ ml/battito} < V_r < 60$ ml/battito
- Rigurgito severo per: $V_r > 60$ ml/battito

Si osservi che, in un individuo sano, il volume di sangue eiettato durante la sistole è di 60-80 ml/battito.

Quando una valvola viene meno alla sua funzione si ricorre a un intervento chirurgico di sostituzione con protesi valvolare cardiaca.

1.2.2 – Protesi valvolari e trend tecnologico

Per le valvole meccaniche esistono svariati modelli con architetture molto diverse tra loro. La cardiocirurgia si serve di questi dispositivi da circa mezzo secolo, arco di tempo nel quale hanno subito sostanziali modifiche strutturali volte a migliorarne l'affidabilità e le performance emodinamiche. Il trend tecnologico negli anni è stato quello di cercare di conciliare gli aspetti puramente industriali con quelli biologici, ovvero si è cercato di progettare valvole che fossero sempre più "simili" a quelle fisiologiche, partendo da ciò che l'industria in quel momento metteva a disposizione. Tra le primissime valvole meccaniche troviamo infatti modelli che, pur adempiendo al compito per il quale sono state fabbricate, differivano completamente in aspetto e comportamento da quelle biologiche. Se si pensa infatti ai modelli *Caged-Ball*, valvole a sfera ingabbiata, hanno un aspetto lontanissimo da quello di una valvola nativa: una sfera ingabbiata in una struttura metallica. Per imitare il processo di chiusura e apertura effettuato dai lembi delle valvole biologiche, si è passati ad un'architettura a "lembi", in cui gli occlusori (leaflets) sono incernierati in un alloggiamento anulare. Si è iniziato prima con i modelli *Tilting-Disc*, in cui l'occlusore è dato da un unico disco circolare metallico, fino ad arrivare alle *Bileaflet* (BMHV – Bileaflet Mechanical Heart Valve), valvole con due occlusori metallici semicircolari. Tentare di fabbricare una valvola meccanica con tre occlusori, cercando quindi di avvicinarsi il più possibile alla realtà fisiologica, sarebbe attualmente troppo gravoso sia da un punto di vista progettuale che economico (considerando economie industriali in larga scala). La bileaflet risulta quindi ancor oggi l'architettura maggiormente utilizzata, ed il trend tecnologico si è spostato dal creare nuovi

modelli alle migliorie progettuali apportabili a questo singolo tipo di valvola meccanica, ottenendo come risultato numerosi modelli di BMHV (figura 1.2).

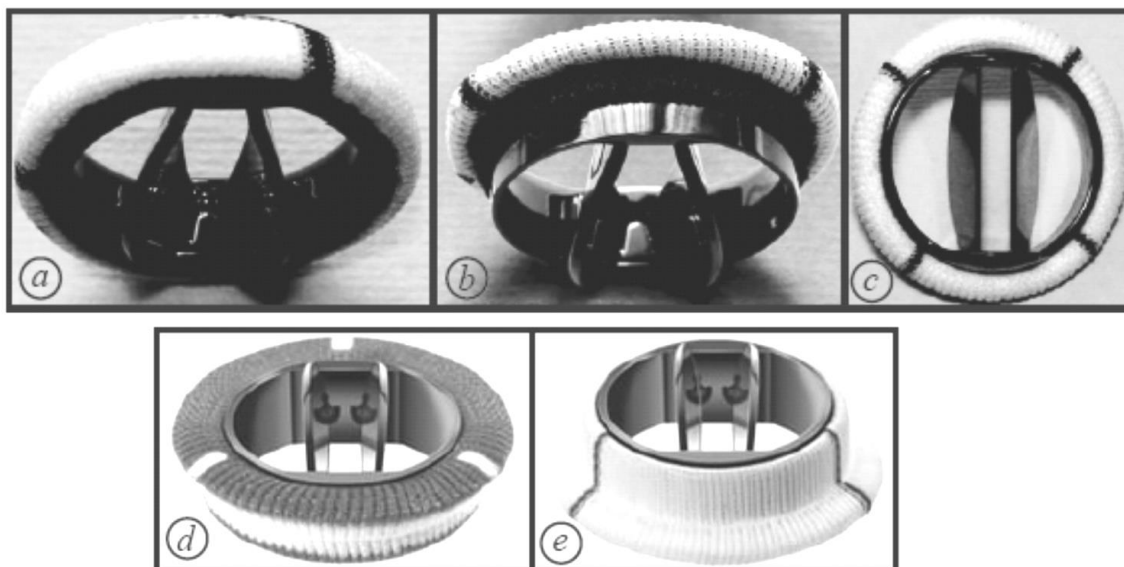


Figura 1.2. Diverse tipologie di BMHV: a) Sorin Bicarbon slimline, b) Sorin Bicarbon overline, c) St. Jude Medical, d) CarboMedics Standard, e) CarboMedics Tophat.

In cardiocirurgia, attualmente, si ricorre a due tipi di protesi valvolari: le valvole biologiche, quindi umane da donatori o animali (generalmente porcine), oppure le valvole meccaniche appena illustrate. Le prime, pur avendo il vantaggio di non richiedere terapie anticoagulanti, sono spesso soggette ad infiammazioni, rischio di rigetto e soprattutto hanno una durata limitata, circa 10-12 anni. È quindi impensabile trapiantare questo tipo di valvola su un paziente giovane, che nell'arco della propria vita dovrebbe sottoporsi a svariati interventi a cuore aperto. Le seconde hanno invece una durata anche di 30 anni, ideali quindi per pazienti con una lunga aspettativa di vita. Necessitano di una terapia anticoagulante a vita, ma senza dubbio preferibile al doversi sottoporre a un altro intervento di cardiocirurgia. Nuove tecniche di innesto mininvasive stanno aprendo uno scenario diverso, sia per la cardiocirurgia negli adulti che nei pazienti pediatrici, prospettando possibili reinterventi senza la necessità di sternotomia (tecniche trans-catetere e trans-apicali).

1.2.3 – Flusso attraverso una BMHV

Per comprendere appieno il modello che si è realizzato con questo lavoro è necessario osservare come si comporta il torrente circolatorio attraverso una bileaflet. I dati e le immagini sono ricavati da una overview compiuta nel 2009 [2] sulla fluidodinamica delle principali valvole artificiali.

Forward Flow Phase.

La maggior parte del flusso emerge dagli orifizi laterali; misurazioni fatte nel piano centrale della valvola, a 8 mm dall'anello, indicano che la velocità negli orifizi laterali è superiore di quella nell'orifizio centrale (2.2 m/s contro 2.0 m/s [2, 3]).

Si osservano, poi (figura 1.3a):

- due zone di ricircolo nel seno della radice aortica;
- elevati sforzi tangenziali nella zona prossima agli occlusori;
- un flusso turbolento a valle della valvola.

Queste condizioni scompaiono durante la fase di decelerazione, quando gli occlusori si stanno per chiudere, dando origine a un flusso abbastanza caotico ma di debole intensità durante questa fase.

Leakage Flow Phase.

Come si è detto in precedenza, una volta che gli occlusori si sono chiusi, rimangono comunque tre fenditure attraverso le quali si ha un lieve flusso di perdita (figura 1.3b): una lieve apertura tra gli occlusori, detta *b-datum gap*, e due aperture tra gli occlusori e l'anello valvolare, dette *periphery gaps*. Questo lieve flusso di leakage è stato in origine designato per "risciacquare" gli occlusori della protesi valvolare, in modo da prevenire ed inibire la formazione di eventuali microtrombi per adesione cellulare agli sportelli. Tuttavia, nella realtà, si è visto come l'entità di questo flusso possa innescare fenomeni di danno locale alle cellule del sangue, a causa del fenomeno di cavitazione (figura 1.4).

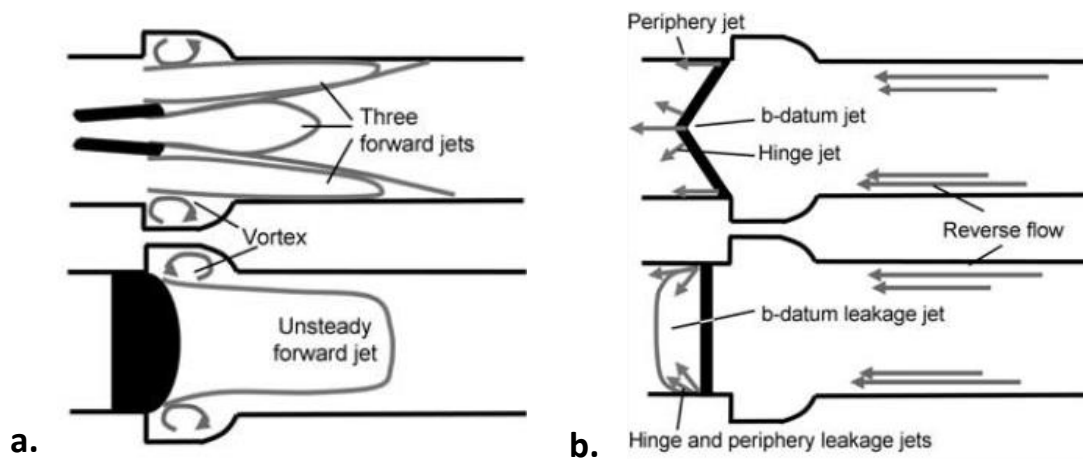


Figura 1.3. Flusso attraverso una valvola cardiaca artificiale Bileaflet (BMHV). **a)** Fase di flusso in avanti (forward flow phase); il flusso passa attraverso tre orifizi, uno centrale tra gli occlusori e due laterali tra gli occlusori e l'anello valvolare. **b)** Fase di flusso di perdita (leakage flow phase).

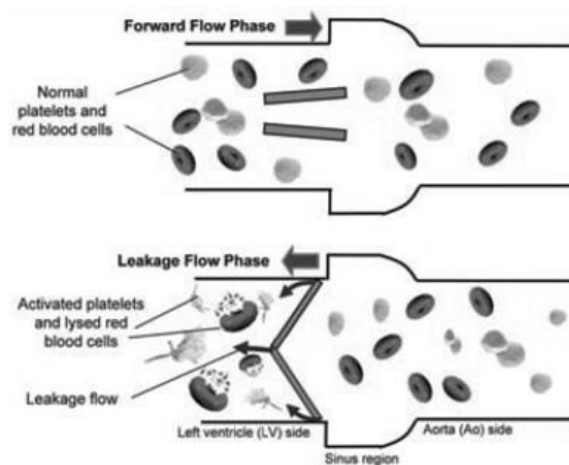


Figura 1.4. Cellule del sangue durante la forward flow phase (sopra) e la leakage flow phase (sotto). Viene rappresentata schematicamente la rottura degli eritrociti e delle piastrine soggetti ad elevati sforzi tangenziali dovuti al leakage flow.

1.3 – RED BLOOD CELLS (RBCs)

Prima di addentrarci nel mondo ingegneristico e di affrontare gli aspetti matematici e meccanici del problema, è senza dubbio utile ed interessante conoscere uno dei protagonisti di questa tesi: l'eritrocita, o globulo rosso.

Essendo questo un lavoro di Ingegneria Biomedica, per quanto il calcolo numerico faccia da padrone, l'oggetto di cui si andrà a parlare non è un componente inanimato, ma una cellula viva ed in continuo movimento.

Ciò suggerisce quindi di osservare, seppur superficialmente, la sfera biologica ed il comportamento della cellula nel flusso emodinamico. Questo per comprendere al meglio le successive scelte nella formulazione del modello comportamentale.

Le caratteristiche di struttura e le proprietà di membrana rendono unica e complessa sia la descrizione biologica che la formulazione matematica capace di descriverla, ma di questo aspetto si vedrà meglio in seguito.

1.3.1 – Geometria cellulare

Gli eritrociti umani (dal greco *erythròs*, «rosso» e *cytos*, «cellula»), ai quali nel seguito ci si appellerà spesso con la sigla **RBCs** (Red Blood Cells), sono dotati, come si è anticipato, di una struttura e una geometria uniche nel loro genere.

- **Struttura:** mentre gli eritrociti degli altri vertebrati presentano nucleo ed organuli citoplasmatici, i globuli rossi maturi dei mammiferi sono cellule anucleate, ovvero prive di nucleo. Dotate di un citoplasma privo di qualsiasi organulo sono estremamente funzionali per svolgere la funzione di portatori della sostanza nutritiva indispensabile per i tessuti dell'organismo, l'ossigeno.
- **Contenuto:** il citoplasma è una soluzione quasi esclusivamente composta da emoglobina (*Hb*) che dona alla RBC la sua peculiare colorazione rossa. Ogni cellula contiene circa $270 \cdot 10^6$ di queste biomolecole per un contenuto cellulare medio di 26-32 pg.
- **Forma:** una tipica RBC umana è un disco a profilo biconcavo (figura 1.5) con un diametro di circa 6,2-8,2 μm ed uno spessore variabile. Nella parte più spessa, alle estremità, misura approssimativamente 2-2,5 μm , mentre nella parte centrale più sottile misura circa 0,8-1 μm . Queste cellule presentano, poi, un volume medio di 90 fL e una superficie di circa 140 μm^2 ; possono modificare il proprio volume interno rigonfiandosi fino ad arrivare a una forma sferica di 150 fL, tutto ciò senza modificare l'area superficiale, ovvero senza distensione della membrana. Ciò è dovuto alla particolare forma biconcava della RBC.

In Tabella 1.1 sono riassunte le caratteristiche geometriche delle RBCs.

CARATTERISTICA	VALORE
diametro del disco	6.2-8.2 μm
spessore massimo	2-2.5 μm
spessore minimo (nel centro)	0.8-1 μm
area superficiale	140 μm^2
volume cellulare medio (<i>MCV</i>)	90 fl (1 fl = 10^{-15} l)
contenuto cellulare medio di Hb (<i>MCH</i>)	26-32 μg (1 μg = 10^{-12} g)
vita	100-120 giorni

Tabella 1.1. Caratteristiche strutturali di una RBC.

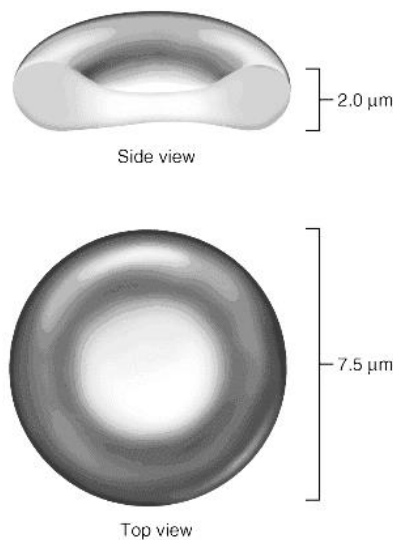


Figura 1.5. RBC vista frontale e laterale.

1.3.2 – Eritropoiesi

Il processo di formazione dei globuli rossi prende il nome di eritropoiesi e dura circa 4-5 giorni. Un uomo in età adulta ha circa $2\text{-}3 \cdot 10^{13}$ globuli rossi (4,5-5 milioni/ mm^3 nella donna e 5-6 milioni/ mm^3 nell'uomo); queste cellule sono quindi le più comuni cellule del sangue essendo in concentrazione nettamente più elevate delle altre. In un millimetro cubo di sangue, infatti, vi sono anche $4\text{-}11 \cdot 10^3$

globuli bianchi e circa $150-400 \cdot 10^3$ piastrine, concentrazioni nettamente inferiori a quelle delle RBCs. Approssimativamente ogni secondo vengono prodotti 2,4 milioni di nuovi eritrociti. Ovviamente la mancanza del nucleo impedisce loro di riprodursi autonomamente, oltre che di avere una biosintesi interna di proteine, quindi la loro produzione è totalmente affidata al midollo osseo. Nascono a partire dalla cellula staminale mieloide CFU-GEMM e, grazie allo stimolo da parte dell'eritropoietina, viene spinta la maturazione verso i progenitori BFU-E e CFU-E. La via differenziativa procede verso i precursori, toccando 5 tappe nelle quali le future RBCs vedono ridursi il nucleo fino a scomparire insieme a tutti gli altri organuli citoplasmatici. Una volta arrivata a maturazione una RBC vive circa 100-120 giorni, dopodiché viene eliminata dal flusso ematico dai macrofagi, a meno di non subire danni tali da dover essere eliminata precocemente.

Le 5 tappe che portano alla maturazione della cellula sono le seguenti:

- **proeritroblasto**: è piuttosto voluminoso con un diametro di 15-19 μm , circa il doppio di quello di una RBC. Presenta un grande nucleo, numerosi poliribosomi e va incontro a numerose divisioni mitotiche;
- **eritroblasto basofilo**: la cromatina è più addensata e le dimensioni sono minori rispetto al precedente stadio. Presenta ancora attività mitotica e ha un citoplasma fortemente basofilo;
- **eritroblasto policromatofilo**: presenta un nucleo più piccolo e una colorazione mista dovuta al passaggio da uno stadio ricco di ribosomi (basofilia) a uno ricco di emoglobina (acidofilia) che determina due colorazioni diverse. È ancora presente la divisione mitotica;
- **eritroblasto ortocromatico** (o ortoblasto): ha un citoplasma acidofilo, una colorazione rosa e un nucleo molto piccolo;
- **reticolocito**: è un eritrocita immaturo che contiene ancora qualche ribosoma e mitocondrio e presenta un fine reticolato dovuto alla precipitazione dei ribosomi. Possono essere presenti nel torrente ematico (circa l'1-8%) insieme ai globuli rossi maturi.

1.3.3 – Funzione delle RCBs

Le RBCs hanno la funzione primaria di trasportare l'ossigeno (O_2) dai polmoni a tutti gli organi e i tessuti del corpo, e di prendere da questi una parte dell'anidride carbonica (CO_2) per portarla ai

polmoni, che provvedono alla sua espulsione all'esterno dell'organismo, tutto ciò in un ciclo circolatorio che dura circa 20 secondi. A tal fine il citoplasma cellulare, che ricordiamo essere privo di organuli, ha in soluzione una particolare proteina, l'*emoglobina (Hb)*.

1.3.4 – Struttura dell'emoglobina

L'emoglobina è una proteina globulare di colore rosso a struttura quaternaria. È composta da 4 sub-unità o globuli proteici, detti *globine* (catene α e β), che presentano al loro interno un gruppo EME, ovvero una molecola di protoporfina che coordina uno ione ferro (Fe), posto leggermente al di fuori del piano della molecola (figura 1.6). È proprio la presenza di questi ioni all'interno dei gruppi EME a rendere possibile lo scambio gassoso ad opera delle RBCs; questi infatti legano l'ossigeno durante il passaggio del sangue nei polmoni e lo cedono successivamente ai tessuti nella circolazione periferica. Il passaggio di O_2 avviene in quanto i legami col gruppo EME sono labili e perché nei tessuti viene prodotta CO_2 che riduce l'affinità tra l'emoglobina e l'ossigeno per il cambiamento del pH.

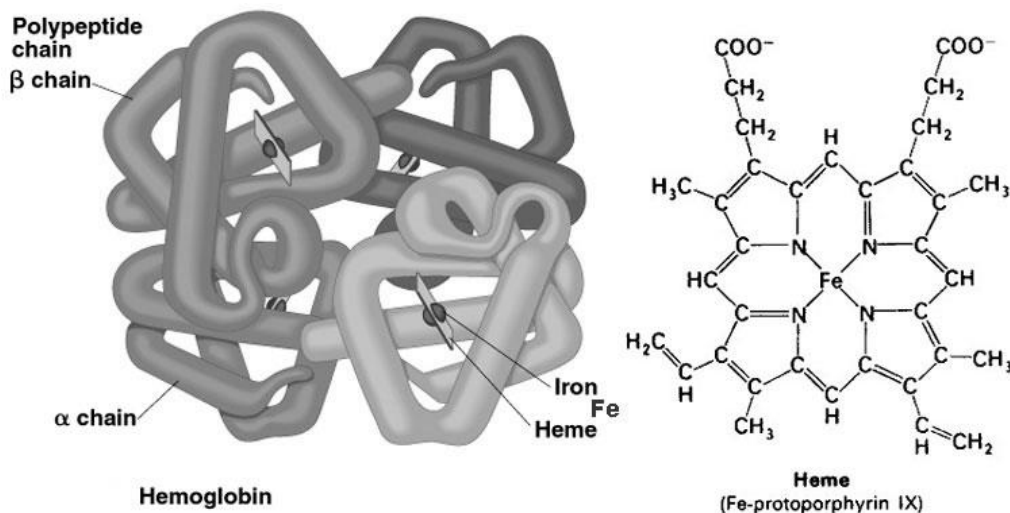


Figura 1.6. Struttura dell'Emoglobina e formulazione chimica del gruppo EME. Le catene α e β hanno al loro interno un gruppo EME in cui alloggia uno ione Fe in grado di legare O_2 .

Sapere che all'interno delle RBCs è presente questa proteina è di grande importanza ai fini di questo lavoro. Infatti l'indice emolitico HI che si va a stimare all'interno del nostro modello tiene in considerazione proprio la quantità di emoglobina (*Hb*) rilasciata dalla lisi cellulare delle RBCs. Anche i modelli già presenti in letteratura tengono conto di questo fattore, anche se in maniera diversa, come si andrà a descrivere nei capitolo successivo.

1.3.5 – Funzioni secondarie delle RBCs

Oltre alla funzione primaria di trasporto dell'ossigeno, gli eritrociti svolgono numerose altre funzioni secondarie, volte soprattutto a favorire la normale circolazione del sangue. In particolare i primi due sono strettamente legati a questo lavoro di tesi:

- Quando sono sottoposti a sforzi tangenziali importanti in vasi contratti, essi rilasciano ATP che porta i vasi a rilassarsi e dilatarsi al fine di promuovere il normale flusso ematico.
- Sempre sotto l'azione di certi livelli di sforzi tangenziali, le RBCs sintetizzano ossido nitrico (NO) enzimaticamente, utilizzando L-arginina come substrato.
- Quando la loro emoglobina viene deossigenata, essi rilasciano nel sangue S-nitrosotioolo (RSNO), un composto organico vasodilatatore, al fine di richiamare una maggiore quantità di sangue nelle aree a bassa concentrazione di O₂.
- Producono e rilasciano nel sangue acido solfidrico (H₂S), un gas ad azione sempre vasodilatante.

Hanno anche un piccolo ruolo nella risposta immunitaria: quando vengono distrutti da agenti patogeni, l'emoglobina rilasciata nel sangue libera radicali liberi che concorrono alla distruzione dei patogeni stessi.

1.3.6 – Membrana cellulare

La membrana cellulare è composta da un doppio foglietto fosfolipidico con strutture trans-membrana per il trasporto. Garantisce proprietà essenziali per le funzioni fisiologiche

dell'eritrocita, come l'estrema deformabilità e la stabilità durante tutto il "viaggio" attraverso il sistema circolatorio.

Lipidi di membrana.

La membrana è simile a quella di ogni altra cellula del corpo umano, che comprende quindi colesterolo e fosfolipidi in uguale proporzione di peso. Essi costituiscono il 60% della membrana. È importante osservare la composizione e la disposizione lipidica nel dettaglio in quanto definisce, in parte, le proprietà fisiche della membrana, come la sua permeabilità ed elasticità. In più, l'attività di alcune proteine di membrana è regolata dai lipidi presenti nel doppio strato.

A differenza del colesterolo, che è presente in entrambi i monostrati, gli altri 5 principali fosfolipidi sono disposti in maniera asimmetrica:

Monostrato esterno (esposto al torrente circolatorio)

- *fosfatidilcolina (PC)*;
- *sfingomieline (SPH)*.

Monostrato interno (non esposto al torrente circolatorio)

- *fosfatidiletanolamina (PE)*;
- *fosfoinositolo (PI)*;
- *fosfatidilserina (PS)*.

Questa distribuzione asimmetrica dei fosfolipidi nel doppio strato è essenziale per l'integrità cellulare e per alcune sue funzioni:

- I macrofagi riconoscono e fagocitano le RBCs che espongono la PS al torrente circolatorio. Esso quindi è disposto nello strato interno e viene a contatto diretto col flusso ematico richiamando i macrofagi solo in caso di rottura della membrana (morte cellulare). Alcune patologie portano alla distruzione prematura del globulo rosso agendo direttamente sulla disposizione dei lipidi di membrana, portando alla disposizione del PS nel monostrato esterno. Inoltre la PS può potenziare l'adesione cellulare delle RBCs alle cellule dell'endotelio vascolare, portando alla possibile formazione di trombi. È quindi essenziale che questo lipide sia disposto nel monostrato interno della membrana durante la vita della cellula.

- I lipidi del monostrato interno possono regolare le funzioni meccaniche della membrana, soprattutto la PS ed il PI. Il primo, legandosi direttamente con la Spectrina, promuove la stabilità della membrana, mentre il secondo regola le interazioni tra diverse proteine di membrana, promuovendole o inibendole, sempre al fine di mantenerne l'integrità.

Proteine di membrana.

Le proteine che compongono lo scheletro della membrana sono responsabili della deformabilità, flessibilità e durabilità della cellula; le permettono di comprimersi e schiacciarsi, facendola anche ripiegare su stessa per passare attraverso i piccoli vasi come i capillari. Questi presentano un diametro anche metà di quello delle RBCs, imponendo una modifica di forma molto marcata ed un incolonnamento delle cellule nel capillare stesso. Le proteine permettono poi alla cellula di tornare alla sua forma originale senza subire danni o lasciare segni.

Esse si dividono in:

- **Integrali:** penetrano saldamente il doppio strato lipidico. Sono proteine di trasporto tra le quali le più abbondanti sono la *banda3* e le *glicoforine*;
- **Periferiche:** formano il citoscheletro che riveste la parte interna della membrana e che fa da supporto strutturale al sovrastante strato lipidico (figura 1.7). Le terminazioni libere dei tetrameri di *spectrina*, la proteina strutturale più abbondante del citoscheletro, sono tenute insieme da catene fibrillari di *actina*, mentre l'ancoraggio alla membrana è garantito dall'*anchirina*.

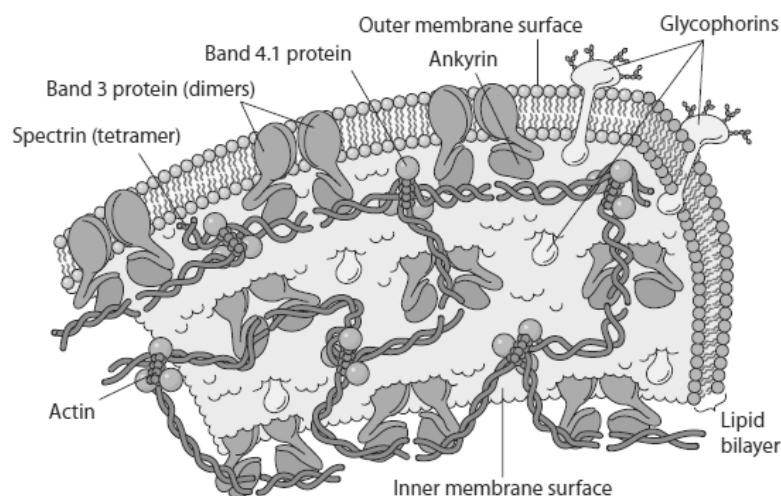


Figura 1.7. Membrana di una RBC. Il doppio strato lipidico è sorretto da un citoscheletro proteico composto da spectrina e tenuto insieme da actina e anchirina.

1.3.7 – Patologie

L'indice di danno che questo modello va a valutare riguarda l'integrità delle RBCs, quindi è bene osservare nel dettaglio le patologie che colpiscono questo tipo di cellule, direttamente collegabili all'impianto di una protesi valvolare. Prima fra tutte l'emolisi, visto che in questo lavoro si arriva a formulare un nuovo indice emolitico; in secondo piano l'anemia, in quanto possibile conseguenza della prima.

Emolisi.

Emolisi è il termine generale per indicare una eccessiva distruzione delle RBCs e ciò può essere causato da diversi fattori. Ovviamente, nei casi più gravi, sfocia in un'anemia, detta appunto anemia emolitica.

- La **malaria** è dovuta alla presenza di un parassita all'interno dell'eritrocita che si ciba della sua emoglobina e successivamente ne esce distruggendone la membrana. Nelle zone in cui è diffusa la malaria sono presenti anche moltissimi casi di anemia falciforme e talassemia in quanto queste modifiche della struttura delle RBCs sono una difesa attuata dalla cellula stessa contro questo tipo di parassita.
- Si incorre in emolisi in risposta a una **errata trasfusione** con conseguente distruzione delle cellule donate da parte degli antigeni delle cellule dell'ospite.
- Le **infezioni batteriche**, poi, da Streptococcus ed Enterococcus causano la distruzione degli eritrociti.

L'emolisi nel breve periodo comporta diverse problematiche dannose per il sistema circolatorio:

- La presenza di frammenti a morfologia variabile di RBCs, detti schistociti, liberi nel sangue può compromettere il normale flusso emodinamico. Questi possono aggregarsi tra loro o ad altre cellule portando alla formazione di trombi, pericolosissimi a livello distale.
- Le RBCs, una volta rotte, rilasciano nel sangue fattori di coagulazione che inducono il richiamo piastrinico; le piastrine che arrivano, se non trovano una reale "ferita" da riparare, si aggregano tra loro o ad altre cellule o a trombi in formazione.
- È da non trascurare, poi, la liberazione nel sangue del contenuto citoplasmatico delle RBCs, ovvero dell'emoglobina (*Hb*); questa, come si è detto, porta all'ossidazione delle altre

cellule del sangue ed è dannosa e nociva, in quantità superiori a quelle fisiologiche, per l'organismo, in particolare per i reni.

Anemie.

Le patologie più comuni sono le anemie di diverso tipo: con il termine anemia si intende un deficit più o meno grave del trasporto di ossigeno da parte degli eritrociti, dovuto a una riduzione notevole del loro numero.

- L'**anemia emolitica** è una riduzione del numero delle RBCs dovuta ad un fenomeno emolitico grave. È quindi una conseguenza dell'emolisi.
- L'**anemia falciforme** (*Sickle-cell disease*) è un tipo di anemia dovuta ad una differenza di un amminoacido nella catena β dell'emoglobina (da glutammato a valina). In condizioni di bassa pressione di ossigeno, questa mutazione causa l'insolubilità dell'emoglobina che si deposita modificando la forma dei globuli rossi (diventano simili a delle falci e da qui il nome inglese *sickle*) e rendendoli meno elastici e più fragili. La forma a falce poi non permette alle RBCs di muoversi agilmente nel torrente ematico, portandoli spesso a incastrarsi e a dare vita a fenomeni di trombosi.
- Le **talassemie α e β** sono anemie genetiche dovute ad una ridotta sintesi di una delle due catene dell'emoglobina e quindi la molecola, nel complesso incompleta, precipita formando granulazioni.
- La **sferocitosi ereditaria** riguarda la forma della cellula, sferica anziché a disco biconcavo, che porta ad una maggiore fragilità delle RBCs, con conseguente anemia.
- L'**aplasia eritroide pura** è una malattia genetica o acquisita che porta il midollo osseo a non produrre più eritrociti.

2

Gli indici emolitici HI (Hemolysis Index)

Si può avere una misura clinica ed una misura ingegneristica dell'emolisi. Nel primo caso vengono utilizzati dati da parametri fisiologici direttamente osservabili mediante prelievo sanguigno; nel secondo caso ci si ricollega al primo mediante parametri analitici, come tensioni e tempi di esposizione a queste.

In clinica per valutare la presenza o meno di un fenomeno emolitico vengono misurati i livelli di emoglobina libera (Hb_{FREE}) nel sangue; questi, a livello basale (Hb_0), ovvero in assenza di emolisi, si aggirano intorno al valore di 0.02-0.05 mg/L. Si parla invece di emolisi, più o meno grave, quando viene raggiunta la soglia di 0.3-0.6 g/L [4]).

In ingegneria per stimare il fenomeno emolitico viene usato un parametro detto Indice Emolitico (HI). Ne esistono di diversi, sempre basati sulla stima della variazione di emoglobina libera nel sangue (ΔHb), in seguito alla lisi delle RBCs, rapportata alla quantità totale di emoglobina presente nell'organismo (Hb_{TOT}):

$$HI(\%) = \frac{\Delta Hb}{Hb_{TOT}}$$

Si comincia a parlare di emolisi quando questo valore raggiunge la soglia di 0.5-1.0 % [4].

Obiettivo del nostro studio è di proporre una formulazione fisicamente basata e globalmente valida per il dispositivo in termini di HI, che sia in grado di stimare con buona accuratezza la pericolosità che comporta l'alterazione del normale flusso emodinamico, dovuta alla presenza di uno specifico dispositivo protesico cardiovascolare (viene trattato qui il caso pratico di una BMHV). Il principio del nostro lavoro è la stima dell'emoglobina totale rilasciata in seguito al danneggiamento e/o rottura delle RBCs, conservando una proporzionalità tra superficie cellulare danneggiata e quantità di emoglobina rilasciata nel torrente circolatorio. Si vuole quindi ottenere

un HI che sia il più possibile simile alla realtà, cercando anche di considerare alcuni aspetti biologici correlati al problema.

In letteratura esistono molti studi che cercano di giustificare il calcolo di HI servendosi di leggi empiriche o approcci sperimentali sulle cellule.

Ci sembra fondamentale passare in rapida rassegna i principali approcci in tal senso, al fine di chiarire la realtà di letteratura, e aiutare l'introduzione del nuovo modello di danno.

PARAMETRO	SIGNIFICATO	VALORE
Hb _{FREE}	Misura dell'emoglobina libera nel sangue	-
Hb ₀	Emoglobina libera nel sangue in assenza di processo emolitico	0.02-0.05 mg/L
ΔHb	Variazione della quantità di emoglobina libera nel sangue	-
Hb _{TOT}	Emoglobina totale presente nell'organismo	750 g*
Hb _E	Soglia emolitica in clinica	0.3-0.6 g/L
Hb _E (%)	Soglia emolitica percentuale	0.5-1.0 %

*valore medio per un uomo adulto

Tabella 2.1. Parametri dell'emoglobina.

2.1 – APPROCCIO INGEGNERISTICO ALLA STIMA DI UN INDICE EMOLITICO

La rottura della membrana di una RBC dipende dall'entità dello sforzo applicato e dal tempo di esposizione allo sforzo stesso. Questa considerazione è ampiamente giustificata ed assodata nella letteratura di settore da circa trent'anni. Ovviamente al crescere delle tensioni applicate alla membrana il tempo di esposizione prima dell'incorrere della lisi cellulare si riduce. Per capire se i carichi imposti ed i tempi di esposizione fossero tra di loro correlati, inizialmente i ricercatori hanno stressato le cellule con il massimo danno sopportabile, per un tempo non-fisiologico. I primi studi di letteratura hanno infatti messo in luce come le RBCs sottoposte a sforzi tangenziali sopra una soglia di 450 Pa presentassero lisi quasi totale, oltre il 90% della rottura della famiglia di RBCs osservata [5]. Tale risultato si è osservato per tempi di esposizione piuttosto lunghi, nell'ordine del minuto, lontani quindi dalla realtà fisiologica, dove gli eventi ricoprono tempi nell'ordine dei millisecondi.

Con l'avanzamento delle tecniche sperimentali sia ottiche che meccaniche, si sono potuti utilizzare tempi di esposizione maggiormente fisiologici; ciò ha permesso di poter studiare con maggiore attenzione la relazione esistente tra lo sforzo applicato alle RBCs e il tempo di esposizione allo stesso.

Negli ultimi dieci anni la letteratura riconosce buona ed utilizza, come soglia critica per lo sforzo, una tensione applicata di circa 150-200 Pa al di sopra della quale lo shear stress (sforzo tangenziale) diventa il fattore preponderante (non l'unico) per la lisi delle RBCs.

Riassumendo dunque i dati da letteratura [5, 6, 7]:

- Per τ da 0 a 150-200 Pa e per $t < 200$ ms non si osservano relazioni evidenti tra le due grandezze e nemmeno danni importanti alle RBCs;
- Per $\tau > 200$ Pa e $t > 200$ ms si ottengono valori di HI > 0.1 %;
- Per $\tau > 400$ Pa e $t > 400$ ms si ottengono valori di HI > 0.5 %;
- Per $\tau > 450$ Pa e $t > 650$ ms si ottengono valori di HI $> 2.5-3$ %;
- Da notare che per $\tau > 450$ Pa e $t > 300$ ms si ottengono sempre valori di HI > 0.5 %; la dipendenza dello sforzo tangenziale dal tempo non scompare mai del tutto.

Al fine di legare lo sforzo tangenziale (shear stress - τ) al tempo di esposizione sono state formulate delle leggi di danno, denominate BDI (Blood Damage Index) o HI (Hemolysis Index), per singoli globuli rossi. Queste sono nella forma:

$$HI = f(t, \tau, \alpha, \beta, A)$$

dove t è il tempo di esposizione al campo dinamico, τ lo sforzo tangenziale che insiste sulla particella, ed α, β, A parametri di derivazione sperimentale (da viscosimetri di Couette [6, 8]).

I primi due approcci di letteratura si basano su questa struttura per f e per la maggior parte dei casi non contemplano il passaggio multiplo delle RBCs attraverso il dispositivo.

2.1.1 – Leggi *all or none*

Definite di solito come [7]:

$$HI = \tau_{CR} t_{CR}$$

Le leggi *all or none* (letteralmente *tutto o niente*) indicano in modo diretto se siamo o meno in presenza di emolisi; individuano delle soglie critiche per lo shear stress (τ_{CR}) e per il tempo di esposizione (t_{CR}), oltre le quali si ha danno o lisi cellulare. Questa netta separazione è il motivo della limitatezza dell'approccio.

Pur riconoscendo la loro utilità per l'individuazione di processi emolitici, non sembrano descrittive del problema fisico non tenendo in alcuna considerazione le condizioni fisiologiche ed il legame tra evoluzione del danno e tempo nel quale questo viene a formarsi. La realtà di danno è infatti di danneggiamento prima parziale; la lisi totale immediata è un fenomeno estremo, anche in presenza di device protesici.

2.1.2 – Leggi di potenza (*power laws*)

In generale definite come [7]:

$$HI = A\tau^\alpha t^\beta$$

Le *power laws* si prefiggono l'obiettivo di pesare i contributi dello shear stress e del tempo di esposizione elevando questi a potenza, con $\alpha < 1$ e $\beta > 1$, pesando poi i valori attraverso il coefficiente A. Sono leggi empiriche, derivate dall'interpolazione di dati ottenuti da esperimenti su viscosimetro di Couette [6, 8, 9, 10]. Nella tabella 2.2 sono riportati i valori ottenuti dagli autori [8, 10, 11]: da notare come per α ci sia pressoché uguaglianza, GW esprima una potenza più che quadratica nella dipendenza dal tempo, e che i diversi A siano anche di un ordine di grandezza differente. In un studio del 2012 [12] vengono messe a confronto diverse *power laws* che utilizzando i tre set di costanti riportati in tabella 2.2; è interessante osservare come in generale GW sovrastimi l'emolisi, mentre HO la sottostimi.

Anche questo approccio non è descrittivo del problema non tenendo in considerazione diversi aspetti fisiologici reali, come ad esempio la geometria cellulare.

MODELLO	α	β	A
GW	0.7850	2.4160	$3.620 \cdot 10^{-5}$
HO	0.7650	1.9910	$1.800 \cdot 10^{-6}$
ZT	0.6606	1.9918	$1.228 \cdot 10^{-5}$

Tabella 2.2. GW, costanti di Giersiepen e Wurzinger [11]; HO, costanti di Heuser e Opitz [8]; ZT, costanti di Zhang e Taskin [10]; A, α e β , costanti nell'equazione della power law.

2.1.3 – Leggi *strain-based*

L'approccio semi-alternativo al precedente, e relativamente recente, è denominato dagli stessi autori "strain-based" [13, 14] ed è completamente numerico. In sostanza si basa sul calcolo dello shear stress τ agente sulle RBCs, modellata numericamente, che viene seguita e calcolata nella sua evoluzione nel tempo nel flusso ricreato con software opportuni di simulazione. Il campo di sforzo deriva dalla formulazione numerica del flusso secondo una relazione sulla membrana modellata a foglietto e viene scaricato sulle areole nelle quali è discretizzato il globulo. Lo shear stress locale così ottenuto viene poi utilizzato all'interno di una formulazione power law infinitesima per il calcolo dell'HI.

Vediamo brevemente ma con un certo dettaglio il modello di RBC utilizzato in uno di questi studi [14] perché di sicuro interesse generale. In particolare, qui si utilizza un modello detto *a goccia (droplet model)*: simula cioè le RBCs immerse nel flusso emodinamico mediante gocce immerse in un altro fluido di diversa densità.

Il calcolo dello shear stress τ viene ottenuto mediante la misura della distorsione istantanea φ_i della forma della goccia all'interno del flusso:

$$\varphi_i = \frac{L_i - B_i}{L_i + B_i}$$

con L_i asse maggiore e B_i asse minore della goccia.

Lo shear stress viene quindi calcolato come:

$$\tau = \mu \frac{2\varphi_i f_1}{(1 - \varphi_i^2) f_2}$$

con $f_1 = 5.0 \text{ s}^{-1}$ e $f_2 = 4.2298 \cdot 10^{-4}$, parametri del modello calibrati per riprodurre lo specifico comportamento delle RBCs: $1/f_1$ incorpora il tempo di rilassamento per la membrana, sperimentalmente osservabile come 200 ms, mentre f_2 incorpora tra gli altri il movimento reciproco tra la membrana e il citoplasma (*tank treading*) e la soglia critica di deformazione per la superficie cellulare. In particolare f_2 è calibrato in modo da accoppiare l'area superficiale della goccia con l'area di emolisi per una RBC (una RBC ha un'area più grande del 40% rispetto a quella di una goccia a parità di volume).

τ viene quindi inserito nella classica power law:

$$HI = A\tau^\alpha t^\beta$$

con $\alpha = 0.785$, $\beta = 2.416$ e $A = 3.62$.

Questo tipo di approccio, a differenza dei precedenti, tiene quindi in considerazione alcuni aspetti legati alla realtà fisiologica ed in particolare geometrica del problema, rimanendo comunque ancorato ad un approccio di tipo power law.

2.2 – IL PROBLEMA DELLA STORIA DI CARICO

Gli indici emolitici presenti in letteratura non tengono in considerazione la storia di carico a cui una singola RBC è soggetta. In tutti questi studi i globuli rossi sono stati trattati come cellule "nuove", ovvero particelle soggette per la prima volta ad uno shear stress, in cui le proprietà fisiche risultano inalterate. Nella realtà è evidente come questo non possa essere vero e come probabilmente non considerare questo aspetto possa essere una semplificazione eccessiva; infatti

piccole o grandi tensioni applicate alle membrane delle RBCs, per diversi periodi di tempo, possono indurre significativi cambiamenti ben prima dell'avvento dell'emolisi.

Tralasciando per ora il fattore età delle RBCs (sono cellule che vivono circa 100-120 giorni quindi la popolazione presente nel sangue è sicuramente un insieme di globuli giovani e globuli anziani con parametri fisici evidentemente diversi), nel tentativo di simulare la storia di carico di una cellula, sono stati sviluppati alcuni *Accumulation Model*, che forniscono un BDI (Blood Damage Index) come integrale dei diversi HI calcolati istante per istante lungo una traiettoria compiuta dalla RBC. Gli approcci riscontrabili in letteratura sono di due tipologie: in entrambi i casi si tratta di ottenere un BDI mediante l'integrazione di un contributo elementare $d(BDI)$ e la differenza sta nella natura di questo contributo.

Nel primo caso l'Accumulation Model è calcolato per integrazione delle della power law, ovvero:

$$d(BDI) = A\tau^\alpha t^\beta$$

$$BDI = \int_{t_0}^t A\tau(\phi)^\alpha (d\phi)^\beta$$

Nel secondo caso viene considerato come contributo elementare la derivata rispetto al tempo della power law:

$$d(BDI) = \beta A\tau(t)^\alpha t^{\beta-1} dt$$

$$BDI = \int_{t_0}^t \beta A\tau(\phi)^\alpha \phi^{\beta-1} d\phi$$

Questi due approcci per l'Accumulation Model sono abbastanza grezzi; il BDI ottenuto è infatti una normalissima sommatoria di contributi infinitesimi, ognuno dei quali calcolato come se ci si trovasse davanti ad una cellula nuova.

Un approccio più elaborato ed interessante è il modello sviluppato da Grigioni et al. nel 2005 [15] che si va a descrivere nel paragrafo successivo.

2.2.1 – Il modello con *dose* di Grigioni

L'idea è quella di inserire questo contributo di tensioni istantanee, precedentemente applicate alla singola RBC, all'interno di un unico parametro meccanico: la *dose* D . Questo viene definito sempre utilizzando una power law:

$$D = t \cdot \tau^{\frac{\alpha}{\beta}}$$

da cui il BDI risulta:

$$BDI = A \cdot D^{\beta}$$

Si prosegue esprimendo D in forma differenziale:

$$\frac{dD}{dt} = \frac{\partial D}{\partial t} + \frac{\partial D}{\partial \tau} \cdot \frac{d\tau}{dt}$$

Dato $BDI = A \cdot dD$, si osserva che il secondo addendo, dell'equazione qui sopra, non può assumere valore negativo in quanto il danno emolitico risulterebbe decrescente col passare del tempo, il che è ovviamente un paradosso; l'unico scenario plausibile è che $d\tau/dt$ sia positivo, ovvero che la tensione applicata alla RBC sia crescente nel tempo, una condizione non per forza vera. Viene assunto quindi che per tempi infinitesimi la tensione applicata alla RBC possa essere considerata costante, azzerando il secondo addendo della forma differenziale di D , e ottenendo così una derivata parziale:

$$dD = \tau^{\frac{\alpha}{\beta}} d\phi$$

da cui integrando dall'istante iniziale di osservazione t_0 , fino al t presente, si ottiene:

$$D(t) - D(t_0) = \int_{t_0}^t \tau(\phi)^{\alpha/\beta} d\phi$$

In un intervallo infinitesimo di osservazione, il BDI è calcolabile come:

$$d(BDI) = d(AD^\beta) = Ad(D^\beta) = A\beta D^{\beta-1}dD = A\beta \left(\int_{t_0}^t \tau(\xi)^{\alpha/\beta} d\xi + D(t_0) \right)^{\beta-1} \tau(t)^{\alpha/\beta} dt$$

da cui integrando da t_0 a t si ottiene il BDI al tempo presente:

$$BDI = \int_{t_0}^t A\beta \left[\int_{t_0}^{\phi} \tau(\xi)^{\alpha/\beta} d\xi + D(t_0) \right]^{\beta-1} \tau(\phi)^{\alpha/\beta} d\phi$$

Il termine:

$$\left[\int_{t_0}^{\phi} \tau(\xi)^{\alpha/\beta} d\xi + D(t_0) \right]^{\beta-1}$$

rappresenta la **dose meccanica completa** sostenuta dalla singola RBC ottenuta mediante la somma delle dosi elementari agenti in ogni intervallo di tempo infinitesimo.

Quello di Grigioni, pur essendo un approccio interessante ed innovativo, non è ancora una storia di carico, nel senso che su passaggi successivi la cellula non si ricorda nulla; è piuttosto una power law modificata, che in un qualche modo cerca di integrare un approccio infinitesimo al calcolo dell'HI totale, ma dietro non prende in considerazione il comportamento meccanico della membrana o del citoscheletro.

Il riportarsi sempre ad un approccio di tipo power law è una tendenza che si vuole abbandonare con il Rupture Model per motivi che verranno spiegati in dettaglio nel Capitolo 4.

3

Modello meccanico di membrana

Le RBCs sono le cellule più deformabili del corpo umano, questa caratteristica deriva dalle proprietà della loro membrana. Questo “semplice” foglietto è il componente meccanicamente fondamentale sia nella descrizione del modello di comportamento del globulo stesso sia in relazione alle sollecitazioni dinamiche al quale esso è sottoposto nel torrente circolatorio. Appare dunque imprescindibile una breve descrizione degli aspetti meccanici direttamente riscontrabili per la membrana, poi riprodotti nel modello meccanico della cellula.

La resistenza alla deformazione nelle RBCs è riassumibile in tre aspetti principali [16]:

- La *geometria della membrana*: a volume costante la forma a disco biconcavo, rispetto ad una forma sferica, permette alla cellula di subire deformazioni senza modificare (aumentare o diminuire) l'area superficiale. Per un dato volume, un solido di forma biconcava presenta una superficie maggiore rispetto ad uno di forma sferica (figura 3.1). Questo aspetto è importantissimo per l'integrità di una RBC: un aumento dell'area superficiale superiore del 3%, porta infatti alla lisi dell'eritrocita. La sua particolare geometria gli permette di poter modificare la propria forma in maniera sostanziale, senza incorrere però in lisi cellulare. Possedere, poi, una maggiore superficie disponibile incrementa e incentiva gli scambi gassosi (O_2 e CO_2) delle RBCs con l'esterno, la funzione primaria di queste cellule.

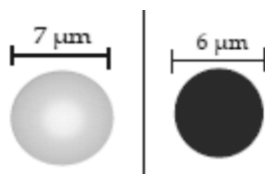


Figura 3.1. Superficie di un solido a forma biconcava confrontata con quella di uno di forma sferica.

- Le *proprietà iperelastiche della membrana*: le RBCs sopportano dilatazioni ben superiori al 2%. Questo aspetto le fa rientrare in quell'insieme di materiali denominati iper-elastici, quali le gomme ad esempio, ma anche molti altri tessuti biologici (elastina, collagene, etc.). Tale caratteristica preserva da rottura la membrana e dona particolari proprietà di resistenza a trazione alla cellula nella sua totalità. L'iperelasticità è una generalizzazione dell'elasticità lineare in quanto questa non è legata alla linearità della risposta ma solamente alla conservazione energetica: infatti la deformazione residua allo scomparire del carico continua ad essere nulla. La trattazione biomeccanica di tale caratteristica non ricade nel campo dei piccoli spostamenti e piccoli gradienti di spostamento ma sarà caratterizzata da grandi deformazioni, attraverso l'uso di una formulazione di energia di deformazione.
- Le *proprietà viscoelastiche della membrana*: viscoelastici sono quei materiali che, sotto l'azione di una forza, mostrano un comportamento intermedio tra quello dei solidi elastici e quello dei fluidi; la loro risposta allo sforzo è quindi in parte di tipo elastico ed in parte di tipo viscoso, risentendo della velocità di deformazione. Mentre nel caso dei solidi elastici e dei fluidi viscosi la risposta ad uno sforzo o ad una deformazione istantanea è anch'essa istantanea ed indipendente dal tempo, nel caso dei materiali viscoelastici essa è dunque una funzione del tempo. Una RBC, quando è sottoposta a deformazione, esibisce un comportamento reologico paragonabile a quello di un materiale viscoelastico. In particolare, la sua membrana esibisce una buona resistenza alle tensioni esterne che spingono la cellula a piegarsi su stessa (*bending resistance*), mentre presenta una resistenza leggermente minore alle tensioni tangenziali (*shear stress*).

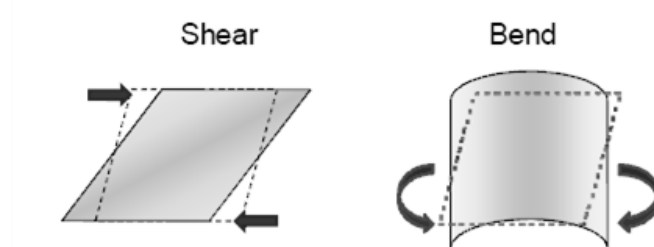


Figura 3.2. Comportamento di una membrana in risposta a sforzi tangenziali (*shear*) e a tensioni di piegamento (*bend*).

Nel seguito si riportano alcune delle tappe fondamentali nella modellazione della membrana delle RBCs riscontrabili in letteratura, con i parametri costitutivi ed i rispettivi valori. I modelli di membrana che si andranno a descrivere tengono conto in parte della geometria cellulare, ma soprattutto del comportamento reologico viscoelastico dell'eritrocita.

3.1 – MODELLI AUTOREVOLI PRESENTI IN LETTERATURA

I modelli 2D che vengono mostrati in questo capitolo, come molti altri presenti in letteratura, utilizzano formulazioni tenso-deformative dove l'espressione avviene in funzione delle tensioni (T). Vengono riportati nell'ordine:

- Il modello viscoelastico proposto da Evans e Hochmuth [17, 18];
- Il modello iperelastico con aggiunta di una componente viscosa proposto da Bagchi e Zhang [19, 20, 21];
- Il modello iperelastico proposto da Skalak [22].

Quest'ultimo verrà utilizzato nella formulazione del Rupture Model con l'aggiunta della componente viscosa di Evans e Hochmuth, usata anche da Zhang.

Si darà importanza alle equazioni matematiche dei diversi modelli, riportando alcuni risultati numerici rilevanti. Verrà, invece, solamente accennata la descrizione della parte sperimentale dei diversi studi con il solo scopo di evidenziarne punti deboli o particolarità, non essendo primaria per il fine di questo lavoro di tesi.

3.1.1 – Modello viscoelastico Kelvin-Voigt (*Evans e Hochmuth*)

Evans e Hochmuth [17, 18] utilizzano una formulazione del primo ordine per descrivere il comportamento viscoelastico delle RBCs. Questa comporta il coinvolgimento di due grandezze: una che rappresenta l'energia elastica e l'altra che rappresenta la perdita di energia meccanica dovuta alla dissipazione viscosa. La RBC viene quindi modellata con la reologia di Kelvin-Voigt (figura 3.3).

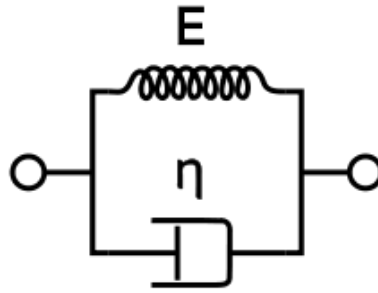


Figura 3.3. Analogia meccanica del modello Kelvin-Voigt, ovvero un dissipatore viscoso collegato in parallelo con una molla (elastica).

Vengono presi in considerazione solo gli sforzi tangenziali, considerando le altre tensioni ininfluenti per la descrizione del modello meccanico di membrana; si considera lo stato tensionale tangenziale totale T_s agente sulla membrana come la somma di due componenti:

- Tensione iperelastica T_e calcolata come:

$$T_e = \frac{E_s}{2} (\lambda^2 - \lambda^{-2})$$

con E_s modulo elastico di membrana, λ rapporto di estensione.

- Tensione viscosa T_v calcolata come:

$$T_v = \frac{2\mu_m}{\lambda} \frac{\partial \lambda}{\partial t}$$

con μ_m viscosità di membrana, t tempo.

La tensione tangenziale totale agente sulla membrana allora risulta:

$$T_s = T_e + T_v = \frac{E_s}{2} (\lambda^2 - \lambda^{-2}) + \frac{2\mu_m}{\lambda} \frac{\partial \lambda}{\partial t}$$

In tabella 3.1 sono riportati i valori utilizzati per il modulo elastico e la viscosità di membrana all'interno del modello.

Parametro	Simbolo	Valore e riferimento
Modulo elastico di membrana	E_s	$6.0 \cdot 10^{-6}$ N/m (<i>Waugh</i> [23, 24])
Viscosità di membrana	μ_m	$6 \div 8 \cdot 10^{-7}$ N·s/m (<i>Hochmuth</i>)

Tabella 3.1. Parametri costitutivi del modello di Evans e Hochmuth con i rispettivi valori utilizzati nelle simulazioni.

I parametri del modello, come il rapporto di estensione λ , derivano da tecniche sperimentali in-vitro per così dire “grezze”: le RBCs sono state gonfiate con soluzione fisiologica, con un conseguente irrigidimento della membrana in questo modo pretensionata, e aspirate mediante micro-pipetta. A causa di queste condizioni non prettamente fisiologiche, i valori dei parametri non sono pienamente attendibili rispetto a quelli ottenuti negli anni successivi con tecniche sperimentali più raffinate. Questo punto debole non è da attribuire agli autori: negli anni '70 l'aspirazione mediante micro-pipetta era considerata una tecnica all'avanguardia nello studio dello stato tenso-deformativo delle membrane cellulari.

3.1.2 – Modello iperelastico neo-Hook con aggiunta di una componente viscosa e della resistenza al piegamento (*Bagchi e Zhang*)

Questo modello, proposto da Zhang nel 2008 [20] modella la tensione agente sulla membrana utilizzando una componente iperelastica di tipo Neo-Hookeana proposta precedentemente da Bagchi [19]. A questa aggiunge un contributo viscoso, secondo le formulazioni di Evans e Hochmuth. Infine, somma il contributo della resistenza al piegamento T_b (bending resistance) lungo la direzione normale alla membrana.

Zhang prende quindi in considerazione uno stato tensionale totale \mathbf{T} agente sulla cellula come la somma di tre distinte tensioni:

- Tensione elastica neo-hookeana T_e calcolata come:

$$T_e = \frac{E_s}{\varepsilon^{3/2}} (\varepsilon^3 - 1)$$

con E_s modulo elastico di membrana, ε rateo principale di deformazione.

- Tensione viscosa T_v calcolata come:

$$T_v = \frac{\mu_m}{\varepsilon} \frac{d\varepsilon}{dt}$$

con μ_m viscosità di membrana, t tempo.

- Tensione di piegamento T_b (bending) calcolata come:

$$T_b = \frac{d}{dl} [E_b(k - k_0)]$$

con E_b modulo di piegamento, k curvatura istantanea della membrana, k_0 curvatura iniziale della membrana, l lunghezza dell'arco di membrana interessato.

Il rateo di deformazione ε viene calcolato secondo la formulazione di Green adottata anche da Evans e Hochmuth:

$$\varepsilon = \frac{1}{2} \left(\frac{l^2 + L^2}{L^2} \right) = \frac{1}{2} (\lambda^2 - 1)$$

con l e L rispettivamente lunghezza deformata e indeformata dell'arco di membrana, λ rapporto di estensione (deformazione) calcolato come l/L .

La tensione totale agente sulla membrana cellulare risulta quindi:

$$T = (T_e + T_v)\mathbf{t} + T_b\mathbf{n}$$

con \mathbf{t} e \mathbf{n} rispettivamente direzione tangenziale e direzione normale rispetto alla membrana.

In tabella 3.2 sono riportati i valori utilizzati da Zhang per i parametri costitutivi del modello.

Parametro	Simbolo	Valore e riferimento
Modulo elastico di membrana	E_s	$6.0 \cdot 10^{-6}$ N/m (<i>Waugh e Hochmuth</i>)
Modulo di piegamento	E_b	$2.0 \cdot 10^{-19}$ N·m (<i>Waugh e Hochmuth</i>)
Viscosità di membrana	μ_m	$3.6 \cdot 10^{-7}$ N·s/m (<i>Waugh e Hochmuth</i>)

Tabella 3.2. Parametri costitutivi del modello di Zhang con i rispettivi valori utilizzati nelle simulazioni.

3.1.3 – Modello iperelastico di membrana (*Skalak*)

Skalak nel 1973 [22] utilizza come modello di membrana di una RBC, un modello 2D iperelastico; non contempla da subito la presenza di una componente viscosa.

Considera l'area superficiale della cellula suddivisa in elementi infinitesimi di membrana soggetti a due deformazioni lungo gli assi principali x e y , dovute all'azione di due tensioni principali T_1 e T_2 (figura 3.4), calcolate come:

$$T_1 = \frac{1}{\lambda_1 \lambda_2} [G \lambda_1^2 (\lambda_1^2 - 1) + B (\lambda_1 \lambda_2)^2 ((\lambda_1 \lambda_2)^2 - 1)]$$

$$T_2 = \frac{1}{\lambda_1 \lambda_2} [G \lambda_2^2 (\lambda_2^2 - 1) + B (\lambda_1 \lambda_2)^2 ((\lambda_1 \lambda_2)^2 - 1)]$$

con G modulo di taglio, B modulo di compressibilità, λ_1 e λ_2 deformazioni lungo le direzioni principali, calcolabili come:

$$\lambda_1 = \frac{dy_1}{dx_1}, \quad \lambda_2 = \frac{dx_2}{dy_2}$$

Con (dx_1, dx_2) lunghezze indeformate, (dy_1, dy_2) lunghezze deformate.

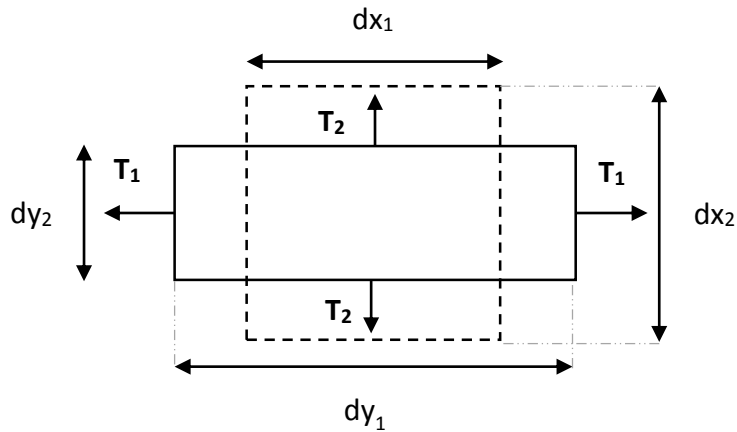


Figura 3.4. Deformazione dell'elemento di membrana lungo gli assi principali. In linea tratteggiata la situazione indeformata con le dimensioni originali dx_1 e dx_2 , deformate poi in dy_1 e dy_2 sotto l'azione delle tensioni T_1 e T_2 .

In tabella 3.3 sono riportati i valori utilizzati da Skalak per il modulo di taglio e il modulo di compressibilità all'interno del modello.

Parametro	Simbolo	Valore e riferimento
Modulo di taglio	G	$5 \cdot 10^{-6}$ N·m (Skalak)
Modulo di compressibilità	B	$5 \cdot 10^{-3}$ N·m (Skalak)

Tabella 3.3. Parametri costitutivi del modello di Skalak con i rispettivi valori utilizzati nelle simulazioni.

Per descrivere il comportamento meccanico della membrana delle RBCs all'interno del Rupture Model, è stato scelto il modello meccanico iperelastico di Skalak. Alla formulazione è stata sommata una componente viscosa secondo la formulazione di Evans e Hochmuth, come si vedrà nel dettaglio nel prossimo capitolo.

Lo stesso Skalak, in studi successivi [25], ha aggiunto una componente viscosa al suo modello, ponendo l'attenzione sui tempi di rilassamento della membrana. Mediante esperimenti con micro-pipetta ha studiato la dipendenza dal tempo del processo deformativo osservando che la membrana esibisce un comportamento bifasico: dopo una rapida fase iniziale di deformazione ($T \approx 0.1-0.2$ s), segue una fase considerevolmente più lenta ($T \approx 5$ s).

All'interno del Rupture Model è stato considerato uno solo di questi due tempi di rilassamento ($T = 0.2$ s); considerare entrambi i tempi risulta troppo difficile a livello matematico e in letteratura nessuno lo fa.

Perché si è optato proprio per il modello di Skalak e non si è ad esempio utilizzato direttamente il modello proposto da Evans e Hochmuth che teneva già in considerazione una componente viscosa?

Questo particolare modello, oltre ad essere il più accreditato in letteratura, ha una formulazione energetica, da cui sono state derivate le equazioni delle tensioni, e valori dei parametri più convincenti. Il modello iperelastico proposto da Evans e Hochmuth a causa della sua linearità non è adeguato in questo particolare caso.

4

Limiti delle power law: un nuovo modello matematico per valutare l'emolisi

Fino ad ora si è fatta una panoramica di alcuni ingredienti essenziali per comprendere quale sia il possibile danno subito dalla parte corpuscolata del sangue nel transito ripetuto attraverso una protesi cardiovascolare.

Si è parlato delle RBCs descrivendone la struttura geometrica e le loro funzioni, in diretto legame alla biologia della membrana. Si è poi mostrato lo stato dell'arte per quanto riguarda i modelli meccanici di membrana, a cui si fa maggiormente riferimento in letteratura. Si è introdotto il problema emolitico dovuto alla presenza di dispositivi cardiovascolari, con riferimento specifico alle protesi valvolari aortiche di tipo meccanico bileaflet. Infine si sono analizzati i diversi approcci per valutare il rischio emolitico dovuto proprio alla presenza di dispositivi protesici.

Questo capitolo vuole essere un punto di incontro per quanto detto sino ad ora, capace di fornire una risposta concreta alle problematiche nella stima del danno che fino ad oggi hanno caratterizzato i modelli proposti. Anzitutto cerchiamo di capire il perché non sembrano affidabili le stime sino ad ora collezionate in letteratura.

Da dove nasce l'esigenza di disporre di un indice emolitico HI affidabile?

L'innesto di dispositivi cardiovascolari comporta due problematiche principali:

- La parte corpuscolata del sangue (piastrine, globuli rossi, eccetera) non è insensibile all'inserimento nel torrente circolatorio di corpi estranei; l'effetto principale sono fenomeni tromboembolici, dovuti al danneggiamento dei corpuscoli che comporta la formazione di trombi spesso associata a un'embolia polmonare.

- Come si è detto in precedenza, l'utilizzo di dispositivi vascolari meccanici richiede una terapia anticoagulante a vita; questa può provocare emorragie, anche distanti dal dispositivo, quindi apparentemente non collegabili. La terapia anticoagulante agisce, infatti, a livello sistemico e non solo localmente.

Risulta quindi evidente il potenziale danno emolitico provocato dalla presenza di dispositivi protesici, da cui la necessità di disporre di un HI affidabile. Poter infatti prevedere quello che sarà lo stress dovuto, è senza alcun dubbio utile dal punto di vista ingegneristico per diversi aspetti:

- Consente di valutare il danno emolitico causato da un dispositivo specifico, per migliorarlo e garantirne un'efficienza sempre più elevata;
- Permette di confrontare diversi dispositivi tra loro, in modo da valutare quale abbia un rischio emolitico più elevato (si intende ovviamente dispositivi per una medesima funzione, ad esempio valvole aortiche);
- Un utile mezzo di interazione con il clinico, il quale ottiene un dato di pericolosità, parametro con cui tarare la terapia farmacologica post-operatoria.

In clinica il danno emolitico viene valutato mediante un prelievo del sangue, osservando la concentrazione di emoglobina Hb nel campione; oltre la soglia di 0.3-0.6 mg/L [4] di Hb libera nel sangue viene "dichiarata" l'emolisi pericolosa.

Ingegneristicamente, il danno viene stimato come rapporto tra la quantità di emoglobina libera nel sangue e l'emoglobina totale presente nell'organismo, calcolato su un numero limitato di cellule:

$$HI(\%) = \frac{\Delta Hb}{Hb_{TOT}}$$

con ΔHb variazione dell'emoglobina libera nel sangue, Hb_{TOT} emoglobina totale presente nell'organismo.

Gli indici emolitici descritti nel Capitolo 2 sono quelli che ad oggi vengono usati ingegneristicamente per valutare il danno emolitico dei dispositivi cardiovascolari e sono direttamente legati all'HI di tipo clinico. Tra questi, il più comune è l'approccio power law (letteralmente, legge di potenza). L'HI viene calcolato a partire da leggi empiriche (basate su

esperimenti con viscosimetri di Couette) come prodotto tra la tensione agente sulle RBCs, il tempo di esposizione ad essa ed una costante moltiplicativa. Il contributo di entrambi i fattori viene pesato mediante l'elevamento a potenza:

$$HI = A\tau^\alpha t^\beta$$

con τ tensione agente sulla RBC, t tempo di esposizione ad essa, A , α e β costanti derivate da esperimenti su viscosimetro [6, 8, 9, 10].

In letteratura esistono molti studi che, utilizzando dati sperimentali diversi, hanno portato alla stima di diversi set per i parametri A , α e β . Considerando, quindi, come "ottimo" questo modo di valutare il danno emolitico, il trend è stato quello di cercare una modifica ai valori dei suddetti tre parametri, giustificandola con risultati di confronto rispetto ad esperimenti *in-vitro*. Altri studi completamente numerici [13, 14] hanno tentato di dare un significato maggiormente legato alla fisiologia del globulo, come ad esempio le leggi strain-based, che hanno aggiunto dei parametri geometrici al problema a riguardo delle cellule e migliorato la definizione numerica del flusso e la dinamica delle geometrie mobili. Quest'ultimi soffrono sempre del calcolo del danno usando una power law, quindi in ogni caso senza una base fisica forte.

In che modo si potrebbe realizzare un indice "migliore" per valutare l'emolisi?

I principali HI descritti finora, quindi, considerano solo l'interpolazione di dati da viscosimetro per stimare l'emolisi, o particolari flussi numerici ricreati ad hoc. Le RBCs, però, non sono semplici corpi che subiscono una deformazione in un determinato intervallo di tempo, con condizioni al contorno geometriche e fluidodinamiche costanti, come avviene nel viscosimetro di Couette. Senza considerare come l'esperimento *in-vitro* secondo questa modalità prevede che le RBCs "vivano" in un contesto biologico nettamente differente da quello fisiologico. Le RBCs sono cellule del sangue, spinte dal torrente circolatorio attraverso tutto l'organismo. Durante il loro viaggio incontrano e si scontrano con altre cellule e, se danneggiate, con alcune di queste possono aggregarsi, venire inglobate in un fenomeno di riparazione dei vasi, o da un trombo. Quando si danneggiano, poi, non si rompono e risultano inermi nell'organismo, ma liberano nel sangue diverse sostanze, come fattori di coagulazione e l'emoglobina. Queste richiamano e attivano altre

cellule, come i macrofagi e le piastrine, determinando una serie di eventi spesso non completamente prevedibili, che possono alterare localmente la circolazione.

Un efficiente HI dovrebbe, quindi, riuscire a tenere in conto degli aspetti fisici e biologici fondamentali, ovvero dovrebbe considerare all'interno della sua formulazione matematica parametri legati agli aspetti fisio-bio-logici, e quindi reali, del problema emolitico.

L'emolisi legata all'impianto di un dispositivo protesico è davvero un problema così impellente?

Finora si è descritta l'emolisi come una conseguenza inevitabile dell'impianto di un device protesico cardiovascolare, e così in effetti è. Bisogna però tenere in considerazione il fatto che l'emolisi rientra nei problemi definiti "a lungo termine", legati a questo tipo di protesi. Non si pensi che in seguito all'impianto, per esempio di una valvola bileaflet, si riscontri un incremento immediato della quantità di emoglobina nel sangue. Anzi, spesso le RBCs che passano attraverso il dispositivo vengono lievemente danneggiate e per di più a seguito di passaggi multipli (milioni) attraverso lo stesso. Di seguito verrà evidenziato come spesso le RBCs non raggiungano mai i livelli critici di emolisi in quanto vengono naturalmente rimpiazzate prima di tale evento dall'organismo, ovvero non sono abbastanza longeve da accumulare la quantità di danno necessaria al raggiungimento della soglia emolitica.

Questo non significa che il problema emolitico sia da trascurare. Il danneggiamento di cellule del sangue, ovvero la presenza all'interno del sistema circolatorio di frammenti "non desiderati" non è un aspetto da sottovalutare. Questi frammenti infatti, grazie proprio alla circolazione, raggiungono zone distali, rispetto alla sede di impianto, e possono partecipare per esempio alla formazione di trombi. Spesso sono proprio i problemi a lungo termine quelli più pericolosi in quanto non palesi, non direttamente prevedibili, ed osservati con meno attenzione solamente al verificarsi dell'evento critico.

4.1 – LIMITI DELL'APPROCCIO *POWER LAW*

L'idea del Rupture Model, portato a compimento dal team di ricerca diretto dalla Prof.ssa Francesca Susin del Dipartimento di Ingegneria Civile Edile ed Ambientale (DICEA), nasce dalla

necessità di prendere le distanze da alcuni limiti dei diversi indici emolitici presenti in letteratura, in particolare legati alle leggi di potenza.

I limiti principali degli HI derivati da power law sono fondamentalmente tre:

- La *non considerazione dei numerosi aspetti legati alla fisica del problema*;
- La *mancaza di informazioni spaziali* riguardo al danno subito dalle RBCs nella valutazione del rischio emolitico per un generico device protesico. Traiettorie diverse innescano danni diversi e ciò risulta fondamentale nella stima del danno specifica per il dispositivo che si vuole indagare, così da sondarne le caratteristiche costruttive in termini di pericolosità emolitica. Il modello power law non dà informazioni a riguardo.
- La *mancaza di un numero sufficiente di cellule osservate* a fronte di quello realmente presente in un dispositivo. Da ciò la definizione di un HI globale per il dispositivo, secondo un volume di sangue di indagine ben definito.

Sul primo limite si sono già spese numerose parole: il Rupture Model nasce proprio per inserire nella propria formulazione parametri legati alla realtà fisica e fisiologica del problema.

Per quanto riguarda il secondo aspetto limitante delle leggi di potenza si rimanda al paragrafo successivo.

4.1.1 – Importanza della componente spaziale mediante approccio sperimentale e numerico integrato

L'emolisi possiede una componente spaziale che non è mai stata del tutto sviluppata in letteratura. L'idea è questa: l'attraversamento di un dispositivo cardiovascolare produce traiettorie, compiute dalle singole RBCs, ad HI più elevato, in termini di singolo passaggio attraverso il device protesico. Questo fenomeno è dovuto al semplice fatto che gli sforzi medi agenti sono di intensità diversa da traiettoria a traiettoria.

Per ricostruire questa componente spaziale è stato usato un approccio integrato: campi di velocità e sforzo, uniti a campi pressori, derivati da analisi sperimentali su pulse duplicator [26], con iniezione numerica di RBCs e calcolo dell'HI in cicli ripetuti per la valvola aortica in esame.

In figura 4.1 vengono mostrate due mappe sovrapposte: sullo sfondo si può osservare il campo degli sforzi tangenziali medi in un ciclo nella radice aortica a valle della valvola bileaflet [26]; in primo piano in rosso si possono invece osservare le traiettorie maggiormente dannose in termini di singolo passaggio attraverso la BMHV [27]. Come si vede facilmente, gli sforzi più elevati si registrano in prossimità dei lembi valvolari e nelle zone superiori di strato limite.

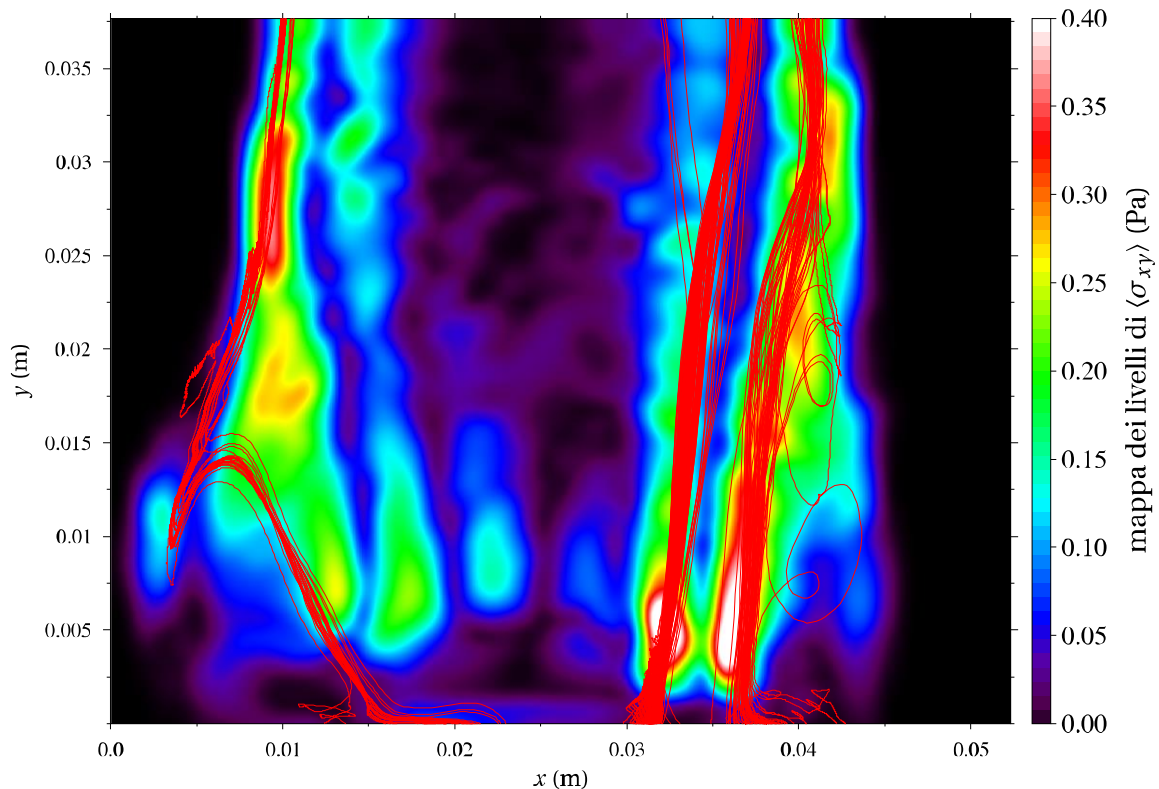


Figura 4.1. Mappa degli sforzi tangenziali medi nel ciclo nella radice aortica a valle della valvola bileaflet con sovrapposte in rosso le traiettorie maggiormente dannose (singolo passaggio).

Il team del laboratorio di Biofluidodinamica Cardiovascolare dell'Università di Padova ha quindi accoppiato l'informazione spaziale con quella di danno: mediante l'iniezione di N particelle per n cicli nel campo di moto registrato in precedenza, è risalito alla stima dell'HI per ciascuna particella mediante una formulazione power law. Ad ogni ciclo ha poi cumulato il danno sfruttando il modello con *dose* [15] visto nel Capitolo 2, ottenendo così una sorta di "danno totale cumulato". Sono quindi state identificate:

- Le traiettorie per le quali il danno è maggiore in un singolo passaggio mediante un *HI unitario*;
- 10 *classi* di danno di appartenenza per le traiettorie stesse, per danno cumulato in seguito a passaggi multipli delle particelle attraverso il dispositivo mediante un *HI cumulato*.

I risultati ottenuti hanno evidenziato degli aspetti non trascurabili [27]:

1. Osservando la distribuzione del numero di traiettorie in termini di HI unitario e in funzione della classe di appartenenza (figura 4.2), si evince che le traiettorie più dannose si trovano nella coda della distribuzione e sono molto meno numerose, ben 4 ordini di grandezza in meno. Questo gap rimarca come la frequentazione delle traiettorie più dannose sia sconsigliata dalla fluidodinamica locale, portando al contenimento dell'indice emolitico, il quale si accumula principalmente per integrazione di danni minori lungo traiettorie preferenziali.
2. Osservando l'HI cumulato in funzione del valore dell'HI unitario diviso in classi di appartenenza (figura 4.3), si nota come l'HI è quasi interamente prodotto dal passaggio lungo le traiettorie che, singolarmente prese, sono meno dannose (90%).
3. Le traiettorie più dannose, seppur poche in numero, hanno un impatto emolitico 10 volte maggiore rispetto alle meno dannose. Questo è un aspetto sicuramente da non sottovalutare nella progettazione di nuove valvole cardiache, ricavabile solo da un'indagine spaziale del processo emolitico.
4. Osservando la scala principale delle ordinate in figura, si nota come l'indice emolitico cumulato su 8 giorni, circa 0.01%, sia molto al di sotto della soglia clinica critica dello 0.5% [4]. Tale livello si raggiunge teoricamente solo con passaggi ben al di là della media di vita di una RBC.

La componente spaziale, per il suo alto contenuto informativo, ha quindi grande importanza nella valutazione dell'emolisi e l'approccio power law non tocca minimamente questo aspetto.

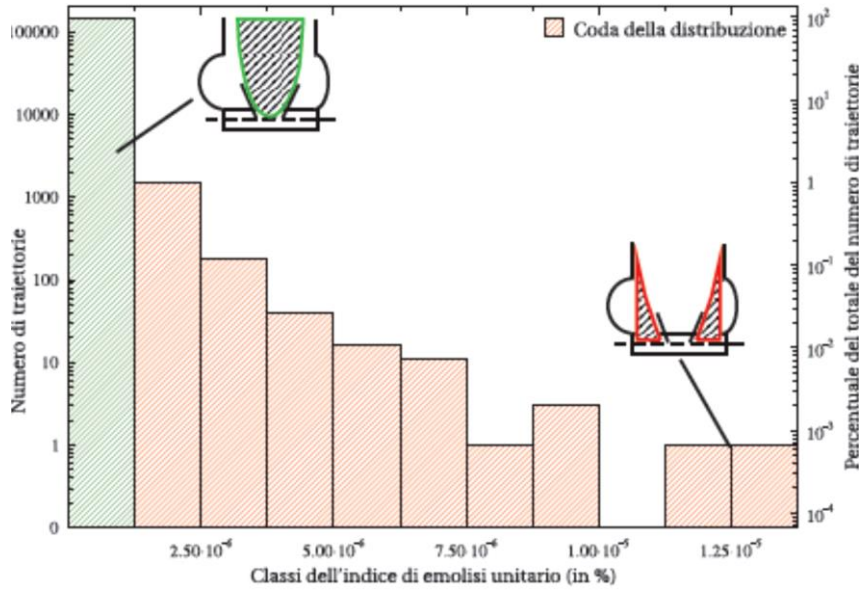


Figura 4.2. Distribuzione delle traiettorie e percentuale del numero totale di traiettorie, in funzione dell'HI unitario, diviso in 10 classi. In verde le traiettorie più frequentate, passanti attraverso la zona centrale della BMHV; in rosso la coda della distribuzione.

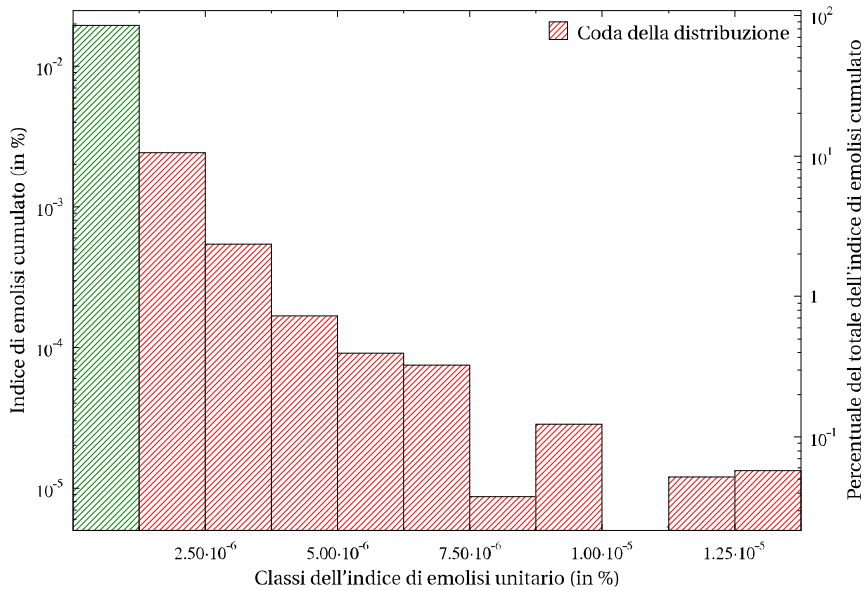


Figura 4.3. Distribuzione dell'HI cumulato e percentuale dell'HI totale cumulato, in funzione del valore dell'HI unitario, diviso in 10 classi. In verde le traiettorie più frequentate; in rosso la coda della distribuzione.

4.2 – IL RUPTURE MODEL

Si passa ora alla descrizione del lavoro portato avanti dal team del laboratorio di Biofluidodinamica Cardiovascolare dell'Università di Padova e seguito in tutte le sue fasi in questo lavoro di tesi.

Il lavoro viene realizzato attraverso tre step fondamentali:

1. In un *campo di velocità 2D*, che replica il flusso trans-valvolare [26], viene iniettato un numero N di particelle e ne vengono calcolate le traiettorie; la conoscenza di queste ci permette di ricostruire la storia delle tensioni e delle pressioni a cui ogni singola RBC è soggetta lungo il suo "viaggio".
2. Viene assegnato un *modello meccanico di membrana* alle RBCs che permette di calcolare, tramite una relazione tensione-deformazione, le deformazioni causate alle singole particelle dagli sforzi indotti su di esse dal campo.
3. Viene stabilito un *criterio di rottura* che permette di valutare quanta emoglobina viene rilasciata da ogni singola RBC danneggiata. Questo parametro viene utilizzato infine per ottenere l'indice emolitico HI del modello, usando la formulazione direttamente derivata dalla clinica.

Nel seguente paragrafo si vanno quindi a descrivere gli "ingredienti principali" del Rupture Model:

- Il campo di flusso nel quale si vanno a iniettare le particelle;
- Il modello geometrico utilizzato per descrivere la forma della singola RBC;
- Il modello meccanico scelto per descrivere il comportamento della membrana delle RBCs in seguito a sollecitazioni esterne;
- Il criterio di rottura per valutare quando la membrana va incontro a rottura e quanto di essa si rompe;
- Il metodo per calcolare l'indice emolitico HI risultante.

Si andranno poi ad illustrare e commentare i risultati ottenuti nelle simulazioni, mostrando i punti forti di questo nuovo approccio ed illustrando il lavoro che deve essere ancora fatto per rendere il modello ancora più descrittivo.

4.2.1 – Campo di flusso bidimensionale

Il campo dinamico di velocità attraverso la BMHV viene direttamente misurato come un campo di velocità 2D. Il gradiente è diverso da zero ($\text{grad}(v) \neq 0$), ed il campo pressorio è anch'esso ottenuto da esperimenti *in-vitro* sempre sullo stesso banco di prova [26]. A questo, si accoppia l'inseminazione numerica di particelle (le RBCs) utilizzando una tecnica di tipo *passive immersed particle* (PIP). Semplificando, le RBCs immerse all'interno del fluido non interagiscono con lo stesso, e non modificano i campi dinamici in un loro intorno (velocità, tensioni e pressioni risultano inalterate dalla presenza delle RBCs, da cui il termine "passive"). Questa ipotesi non è lontana dalla realtà fisiologica in quanto le particelle indagate sono estremamente piccole rispetto al dominio di indagine: si sta infatti parlando di particelle dell'ordine dei μm , inserite in un vaso dell'ordine dei centimetri (10^{-6} m vs. 10^{-2} m). Per la loro piccola dimensione è lecito quindi supporre che il campo non risenta della loro presenza e non modifichi le proprie condizioni.

Sebbene il gradiente delle velocità non sia uniforme, ovvero le velocità istantanee in diversi punti del campo siano diverse, l'ipotesi del PIP ci permette una soluzione semplificata delle equazioni di membrana. La soluzione matematica era stata già data da Jeffery nel 1922 [28] per corpi sferici immersi in un campo a gradienza nulla ma interagenti per dimensioni non infinitesime con il campo stesso. Si ottengono così le tensioni su ogni singola RBC nel campo di moto, nei diversi istanti dt .

In figura 4.4 è mostrato il campo di velocità qui usato, con volume sistolico $SV = 64$ ml e $T = 2.4$ s (caratteristiche fluidodinamiche fisiologiche, se scalate secondo la similitudine dinamica opportuna).

4.2.2 – Modello geometrico per la singola RBC

È importante osservare, prima di addentrarci nella descrizione del modello meccanico, come si è deciso di modellare la geometria della singola RBC all'interno del flusso.

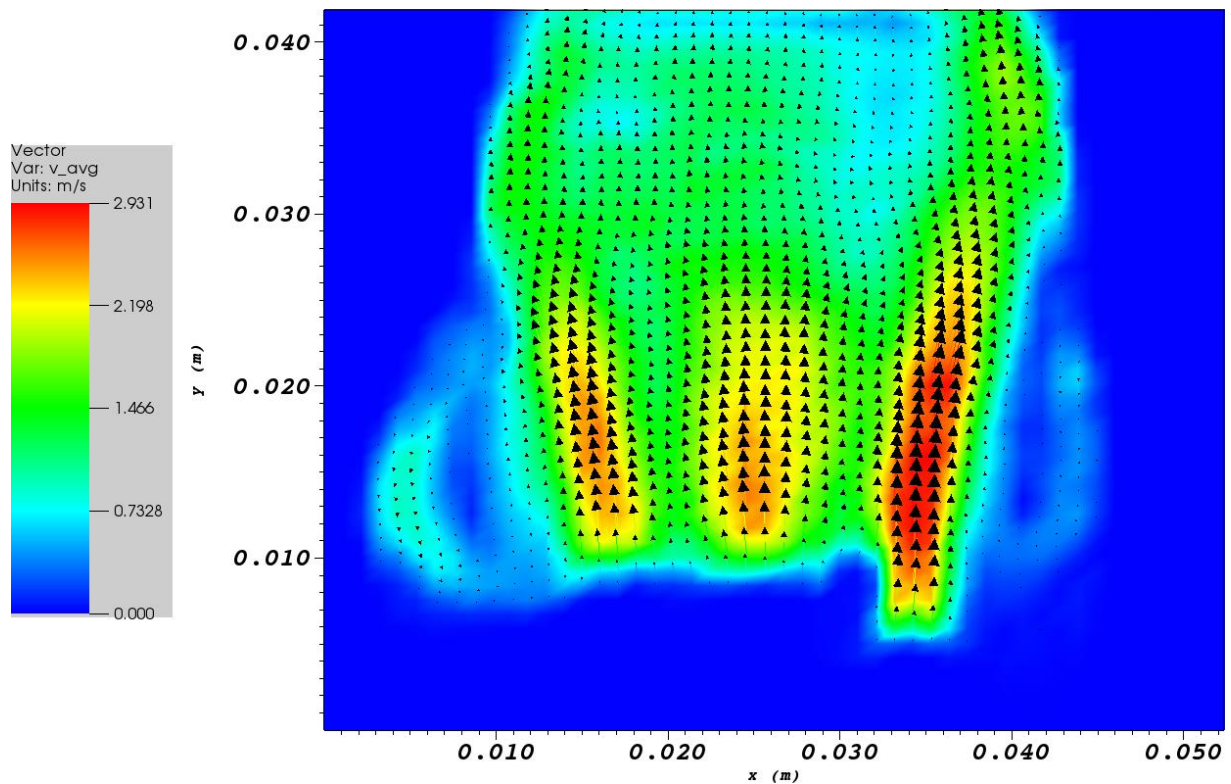


Figura 4.4. Campo di velocità sperimentale all'istante del picco di sistole (SV = 64 ml, T = 2.4 s).

L'ellissoide.

Le RBCs all'interno del Rupture Model non vengono descritte come oggetti puntiformi, ma vengono dotate di forma specifica e dimensioni misurabili. Come si è descritto in precedenza, un globulo rosso è descrivibile come un doppio disco biconcavo; ciò gli assicura la capacità di adempiere al meglio alla sua funzione primaria: lo scambio gassoso, oltre alla resistenza alle grandi deformazioni. Modellare una forma così complessa risulterebbe ovviamente molto oneroso e introdurrebbe delle difficoltà di calcolo eccessive. Ridurre le RBC ad una sfera potrebbe essere un'approssimazione conveniente dal punto di vista computazionale, ma anche una semplificazione inaccettabile dal punto di vista concettuale e fisico: troppo lontana della realtà fisiologica e dalla sua risposta meccanica. Si è optato, quindi, per la forma ellissoidale, soprattutto per due motivazioni principali:

- L'ellissoide è la forma che si avvicina di più al doppio disco biconcavo in moto all'interno del flusso. Si è visto, infatti, come una RBC nel torrente ematico assuma una forma

tridimensionale *a fuso*, o simile. Un ellissoide, quindi, si avvicina molto a questa condizione geometrica reale;

- La possibilità di mappare questa particolare forma su una sfera (e viceversa), mediante una trasformazione lineare.

Ellissoide posizionato nel flusso.

Le RBCs, all'interno del torrente ematico, vengono spinte dal sangue e trasportate attraverso l'intero sistema circolatorio. Durante il loro viaggio subiscono, come si è già evidenziato più volte, numerose deformazioni e, ovviamente, rotazioni intorno ad assi arbitrari; queste ultime introducono non poche difficoltà nelle simulazioni. In questa fase della realizzazione del modello, come semplificazione, si suppone che le RBCs rimangano parallele alla direzione del flusso. L'ellissoide viene quindi posizionato in direzione del campo con il semiasse maggiore sovrapposto al piano del flusso, come si può vedere in figura 4.5. I semiassi a e b si trovano quindi entrambi sullo stesso piano, il primo parallelo alla direzione del flusso, mentre il secondo trasversale ad esso. Il terzo semiasse c nella configurazione 3D risulta ortogonale ai precedenti.

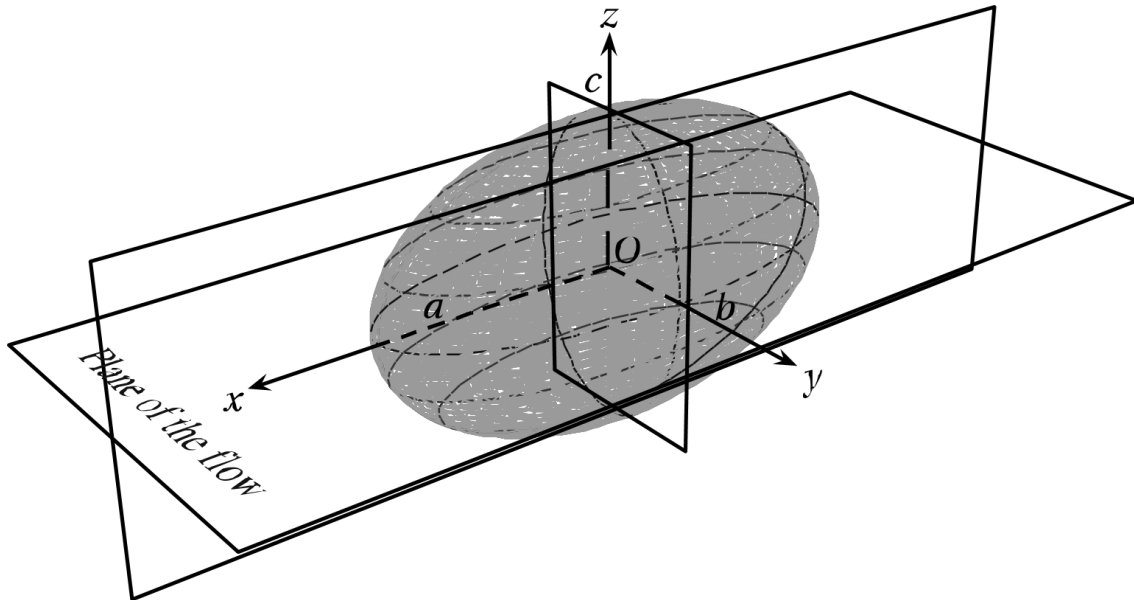


Figura 4.5. Caratteristiche geometriche globali del modello. La RBC è modellata come un ellissoide con l'ellisse maggiore 2D di semiassi a e b giacente sul piano del flusso, con a lungo la direzione del flusso e b trasversale ad esso; il semiasse c dell'ellissoide risulta perpendicolare ad entrambi.

Il fattore età.

Le RBCs nel sangue risultano ad un primo sguardo globalmente tutte uguali tra loro, in realtà così non è: il parametro per il quale differiscono è l'età. Una cellula di questo tipo vive circa 100-120 giorni, dopodiché viene fagocitata dai macrofagi e rimpiazzata da una RBC nuova. Quindi all'interno del volume di sangue fisiologico si trovano famiglie di RBCs "giovani", dai 10 ai 40 giorni di età, e famiglie di cellule più anziane, 80-90 giorni di età. È abbastanza facile tradurre questo fattore: le cellule più anziane saranno quasi sicuramente più "fragili" a causa dell'età, e soprattutto della lunga storia di carico che da questa deriva. Una via per modellare il fattore età potrebbe essere per esempio quella di costruire diversi modelli di membrana, con diversi valori per i moduli elastici e viscosi, a seconda dell'età cellulare, ma fino ad ora non si hanno le sufficienti conoscenze per modellare una legge corretta di invecchiamento. Si ricorre in questo lavoro ad uno stratagemma diverso, ma interessante: si agisce sulla dimensione. Il fattore età viene inserito all'interno del modello geometrico anziché all'interno delle equazioni matematiche di quello di membrana, semplificandone notevolmente la trattazione. Le dimensioni dei tre semiassi principali a , b e c sono diverse per ognuna delle N particelle inserite nel modello, in accordo con le diverse età delle RBCs. Le misure sono ricavate da dati sperimentali [29].

In tabella 4.1 vengono riportate le medie dei tre parametri.

Parametri geometrici medi					
RBCs giovani			RBCs anziane		
a	b	c	a	b	c
7.410	1.175	2.677	5.822	1.357	2.537

Tabella 4.1. Valori dei semiassi dell'ellissoide nel modello geometrico per le RBCs. Le misure di a , b e c sono in μm .

Il citoplasma.

Nella realtà la membrana e il citoplasma sono in movimento reciproco, studiato e presente in letteratura [30, 31, 32], definito come *Tank-Treading* (ricorda infatti il movimento dei cingoli di un carro armato). Lo spessore della membrana è dell'ordine dei nanometri (circa 10 nm), mentre il diametro di una RBC è di circa 8 μm , il che ci definisce un rapporto tra i due di 1/800. La

membrana risulta quindi molto sottile se confrontata con la dimensione totale della cellula. Sembra ragionevole assumere come ipotesi che la pressione idrostatica sia la stessa su entrambi i lati della membrana, ovvero che la pressione esercitata dal sangue sia uguale a quella esercitata dal citoplasma, in tutto il ciclo cardiaco. Il liquido citoplasmatico viene modellato come incomprimibile ed privo di moto.

4.2.3 – Modello meccanico di membrana

La scelta di un modello meccanico che descriva il comportamento di una cellula non è banale. Per prima cosa si deve provare a immaginare, tramite la propria sensibilità, di fronte a quale materiale ci si trova. Una RBC può essere immaginata come una “pellicola” semi-fluida, quindi sicuramente dotata di proprietà viscoso. Osservando poi i dati sperimentali presenti in letteratura, si sa che questa particolare cellula possiede anche proprietà elastiche; è in grado infatti di recuperare la propria forma in seguito a deformazioni subite da tensioni fisiologiche. In certi casi, sotto grandi tensioni, è stato notato come la RBC manifesti un comportamento plastico, quasi fosse un semi-solido [33]. Questo aspetto però è stato riscontrato per tensioni non fisiologiche, al di fuori del nostro campo di interesse.

In definitiva, quindi, un buon modello meccanico di membrana per le RBCs è un modello iperelastico con aggiunta di una componente viscoelastica.

Componente iperelastica.

Le RBCs all'interno del sangue sono soggette a grandi deformazioni, si parla anche fino al 250% come deformazione locale di un'areola superficiale del globulo.

Viene quindi scelto per la componente elastica di membrana il modello iperelastico 2D proposto da Skalak [22]. Le tensioni T_1 e T_2 lungo le direzioni principali, sono applicate ai singoli frammenti infinitesimi δA della superficie esterna della membrana, generando una variazione ΔA dell'area di queste (figura 4.6).

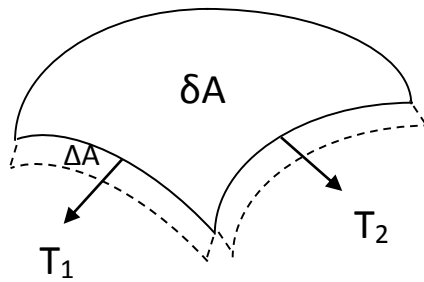


Figura 4.6. Frammento di area δA soggetto alle tensioni T_1 e T_2 lungo le direzioni principali di deformazione. Variazione dell'area superficiale ΔA in entrambe le direzioni di deformazione.

Le T_1 e T_2 vengono esplicitate secondo il modello di Skalak come:

$$T_1 = \frac{1}{\lambda_1 \lambda_2} [G \lambda_1^2 (\lambda_1^2 - 1) + B (\lambda_1 \lambda_2)^2 ((\lambda_1 \lambda_2)^2 - 1)]$$

$$T_2 = \frac{1}{\lambda_1 \lambda_2} [G \lambda_2^2 (\lambda_2^2 - 1) + B (\lambda_1 \lambda_2)^2 ((\lambda_1 \lambda_2)^2 - 1)]$$

con T_1 e T_2 tensioni lungo le direzioni principali (modello 2D), λ_1 e λ_2 deformazioni lungo le direzioni principali, G modulo di taglio (a tutti gli effetti una tensione, essendo la membrana estremamente sottile), B modulo di compressibilità (*bulk modulus*).

Componente viscosa.

Al modello iperelastico di Skalak deve essere aggiunta, ovviamente, una componente viscosa. Viene in questo studio scelta l'opzione largamente utilizzata da Evans e Hochmuth [17, 18]:

$$\frac{\mu_M}{\lambda_1} \frac{d\lambda_1}{dt}, \quad \frac{\mu_M}{\lambda_2} \frac{d\lambda_2}{dt}$$

con μ_M modulo viscoelastico della membrana, $d\lambda_1/dt$ e $d\lambda_2/dt$ velocità di deformazione lungo le direzioni principali.

Le tensioni principali T_1 e T_2 agenti sull'elemento di membrana δA risultano aggiornate alle seguenti:

$$T_1 = \frac{1}{\lambda_1 \lambda_2} [G \lambda_1^2 (\lambda_1^2 - 1) + B (\lambda_1 \lambda_2)^2 ((\lambda_1 \lambda_2)^2 - 1)] + \frac{\mu_M}{\lambda_1} \frac{d\lambda_1}{dt}$$

$$T_2 = \frac{1}{\lambda_1 \lambda_2} [G \lambda_2^2 (\lambda_2^2 - 1) + B (\lambda_1 \lambda_2)^2 ((\lambda_1 \lambda_2)^2 - 1)] + \frac{\mu_M}{\lambda_2} \frac{d\lambda_2}{dt}$$

In tabella 4.2 sono riportati i valori utilizzati in letteratura [17, 18, 22, 34, 35, 36] per i diversi parametri del modello, evidenziando quelli utilizzati per il Rupture Model.

Parametro	Simbolo	Valore e riferimento
Modulo di taglio	G	$5 \div 10 \cdot 10^{-6}$ N/m (Rand, Sutura, Skalak, Blackshear)
Modulo di compressibilità	B	$5 \cdot 10^{-3}$ N/m (Skalak)
Viscosità di membrana	μ_m	$6 \div 8 \cdot 10^{-7}$ N·s/m (Evans, Hochmuth)
Tempo di rilassamento	T	$0.1 \div 0.2$ s (Skalak, Bronkhorst)

Tabella 4.2. Valori dei parametri costitutivi del modello. In grassetto sono riportati i valori utilizzati nel Rupture Model; tra parentesi i riferimenti di letteratura per i diversi parametri. *Condizione di sicurezza:* viene scelto il modulo di taglio G più debole tra quelli presenti in letteratura per evitare di sottostimare la rottura delle RBCs, ovvero il rischio emolitico. *Tempo di rilassamento:* esiste un secondo tempo di rilassamento per le RBCs ($T = 5s$) qui non implementato in quanto risulta estremamente complicato a livello matematico inserire nel modello due tempi di rilassamento.

4.2.4 – Criterio di rottura

Per valutare quando la singola RBC si rompe, viene considerato un criterio di *fragile rupture*. Ovvero, superata una determinata soglia di deformazione per la superficie, si ha rottura della stessa; per valori di deformazione al di sotto di questa soglia non si riscontra alcun danno per la

cellula. Sicuramente questo è un limite al modello, ma risulta anche il miglior modo di approcciare un problema (quello del meccanismo di rottura) tutt'altro che banale.

Viene impostata una soglia di deformazione λ_g (globale) per la superficie totale della cellula e una soglia di deformazione λ_l (locale) per la singola porzione di superficie δA , entrambe calcolabili in relazione al rapporto tra la lunghezza finale di deformazione e la lunghezza iniziale dello stato non deformato.

In tabella 4.3 sono riportati i valori scelti per le soglie di deformazione.

Parametro	Simbolo	Valore e riferimento
Soglia di deformazione globale	$\lambda_g = l_f/l_i$	1.2÷1.3 (Skalak)
Soglia di deformazione locale	$\lambda_l = l_f/l_i$	2.0÷2.35÷2.5 (Tran-Son Tay)

Tabella 4.3. Parametri di rottura. In grassetto sono riportati i valori utilizzati nel Rupture Model; tra parentesi i riferimenti di letteratura per i diversi parametri. La soglia ($\lambda_g = 1.3$) equivale al 30% di deformazione per lato; la soglia ($\lambda_l = 2.35$) equivalente al 135% di deformazione per lato.

4.2.5 – Stima dell'indice emolitico HI all'interno del Rupture Model

Dopo aver descritto il modello comportamentale della singola RBC, e dopo aver impostato una soglia di rottura per la stessa, si va ora ad osservare come viene calcolato l'indice emolitico HI del Rupture Model, al fine di quantificare il fenomeno dell'emolisi.

Anzitutto la singola RBC danneggiata rilascia nel torrente circolatorio una quantità di emoglobina direttamente proporzionale al rapporto tra la superficie cellulare danneggiata e quella totale.

L'indice emolitico del Rupture Model viene calcolato a partire sempre dall'indice percentuale:

$$HI(\%) = \frac{\Delta Hb}{Hb_{TOT}}$$

dove ΔHb è la variazione di quantità di emoglobina libera nel sangue, ovvero l'emoglobina rilasciata nel sangue dalle RBCs danneggiate, Hb_{tot} indica la quantità totale di emoglobina nell'organismo, ovvero la somma tra la quantità basale di emoglobina libera nel sangue Hb_{bas} e l'emoglobina contenuta nelle RBCs.

Nel Rupture Model questi due parametri vengono ridimensionati al volume di riferimento dell'esperimento e al numero di particelle utilizzate. La quantità totale di emoglobina nel volume di riferimento Hb_{tot} diventa:

$$Hb_{tot} = \frac{Hb_{bas}}{V_{tot}} \cdot V_{ref} + Hb_{RBC} \cdot N$$

con V_{tot} volume totale di sangue contenuto nell'organismo, V_{ref} volume di riferimento, Hb_{RBC} quantità media di emoglobina contenuta in una singola RBC, N numero di particelle iniettate.

Il primo termine indica il livello basale di emoglobina libera nel sangue ridimensionato al volume di riferimento, mentre il secondo la quantità totale di emoglobina contenuta nelle N RBCs iniettate nello stesso volume.

La quantità totale di emoglobina rilasciata dalle RBCs danneggiate ΔHb è calcolata come:

$$\Delta Hb = \sum_{i=1}^M Hb_{free}^{RBC}(i)$$

con M numero di particelle danneggiate, $Hb_{free}^{RBC}(i)$ quantità di emoglobina rilasciata dalla i -esima cellula danneggiata.

La quantità di emoglobina rilasciata dalla singola RBC danneggiata è, come si è detto, proporzionale al rapporto tra la superficie cellulare danneggiata e quella totale; la superficie danneggiata è uguale alla somma delle singole δA per le quali è stata superata la soglia λ_l . Quindi, Hb_{free}^{RBC} rilasciata da una RBC che ha subito danno è una quantità diversa da cellula a cellula; dipende appunto da quanta superficie cellulare è stata rotta.

4.2.6 – Evidenze dal modello

Il Rupture Model presentato in questa tesi è stato costruito basandosi su una descrizione fisica del problema emolitico e, oltre a fornirci una stima per HI, la sua validazione ha permesso di confermare la sua capacità di cogliere i principali aspetti del fenomeno indagato, cioè:

- L'elevato gradiente di velocità del flusso attraverso la valvola;
- Le regioni di vorticità (seni di Valsalva);
- L'effetto dello strato limite dovuto alla presenza dei leaflet ed alla loro dinamica;
- Informazioni di tipo spaziale (e non solo temporale) del processo.

In questo paragrafo si vanno ad osservare i risultati ottenuti da simulazioni sul Rupture Model (RM), commentandoli opportunamente. Si mostrano quali sono i suoi punti forti andando anche a realizzare un confronto con gli studi Power Law (PW), evidenziando i limiti degli approcci convenzionali.

Confronto funzionale.

Vediamo ora quali sono i limiti delle PW evidenziati dai risultati ottenuti utilizzando come base a loro accoppiata il RM, ed andiamo a fare un confronto funzionale tra i due modelli.

Quello che viene messo in luce dal team della Prof.ssa Susin è che l'HI globale fornitoci dal metodo PW, applicato al medesimo campo sperimentale [26], ci dice fondamentalmente che tutto il danno è dovuto alle cellule che passano attraverso la zona centrale della valvola, ovvero praticamente ogni RBC che passa attraverso la BMHV contribuisce in minima parte al calcolo di HI essendo queste le traiettorie consigliate dalla fluidodinamica locale (figura 4.2 e figura 4.3). Concettualmente questo risultato appare discutibile. Significherebbe infatti che ogni cellula che transita attraverso il device protesico accumula dei danni tali da generare rottura locale della membrana. Sottolineiamo il fatto che l'informazione di tipo spaziale ottenuta nei calcoli fatti con le PW è stata possibile accoppiando a queste leggi un campo sperimentale in cui ogni singola RBC viene osservata lungo la sua traiettoria, in quanto di per sé, come abbiamo già detto, le PW non danno nessuna informazione spaziale. La legge PW dunque non discerne tra le traiettorie e calcola brutalmente una sommatoria su contributi a discrezione della sola soglia di sforzo e tempo di

esposizione al campo fluido, questo effetto appare palese se si possono osservare i suoi effetti in modo “spaziale” come sopra descritto e visivamente apprezzato in figura 4.1.

In letteratura non sembrano esistere studi che sottolineano tale carenza concettuale delle PW ed è proprio da questo che può nascere l’idea di un indice emolitico diverso, e più efficace.

Concentriamoci ora sui risultati del RM. Il modello identifica le traiettorie compiute dalle $N = 1000$ RBCs iniettate in un ciclo, visibili in figura 4.7; in rosso sono evidenziate le traiettorie delle M cellule danneggiate (in qualunque soglia di sforzo), ovvero le traiettorie delle cellule che generano rottura locale della membrana. Si osserva che le regioni dei due seni di Valsalva, la zona di prossimità ai leaflet e dove lo strato limite generato per i due diversi moti fluidi generati in eiezione (vorticoso e lineare quasi a lamine) si riattacca alle pareti, sono le aree maggiormente sospette per la formazione del danno. Infatti qui si è in presenza di elevati sforzi tangenziali, ma non solo: le cellule che finiscono in queste regioni vi rimangono intrappolate per un periodo lungo, che dilata il tempo di esposizione al campo degli sforzi, incrementando il danno emolitico subito dalla singola RBC. Ovviamente nella regione di strato limite tra i getti laterali non è il tempo di residenza a far da termine principale al danno quanto l’elevato gradiente di velocità.

Si può affermare dunque come l’HI ottenuto con il RM non risente di importanti contributi “spuri” come nel caso delle PW: al suo interno non vi sono i contributi delle traiettorie preferenziali per il campo di moto; ovvero l’HI è interamente dovuto a danni provocati alle RBCs da condizioni fluidodinamiche “diverse” dal fisiologico, create dalla BMHV. Concettualmente questa osservazione sembra ragionevolmente corretta e prende le distanze dalle PW, le quali non pesano i contributi nel calcolo dell’HI globale. Queste non derivano da una base fisica attendibile: tentano di collegare i risultati ottenuti da esperimenti con condizioni non fisiologiche (viscosimetri di Couette) ad un fenomeno fisiologico molto più complesso e con condizioni di sforzo e tempo di esposizione diverse.

Valutazione del Rupture Model accoppiato al flusso attraverso BMHV.

Per valutare la bontà descrittiva del modello nell’accoppiamento al campo di moto sperimentale mettiamo alla prova le sue componenti, confrontando i risultati ottenuti con la letteratura del settore per studi numerici e sperimentali su BMHVs.

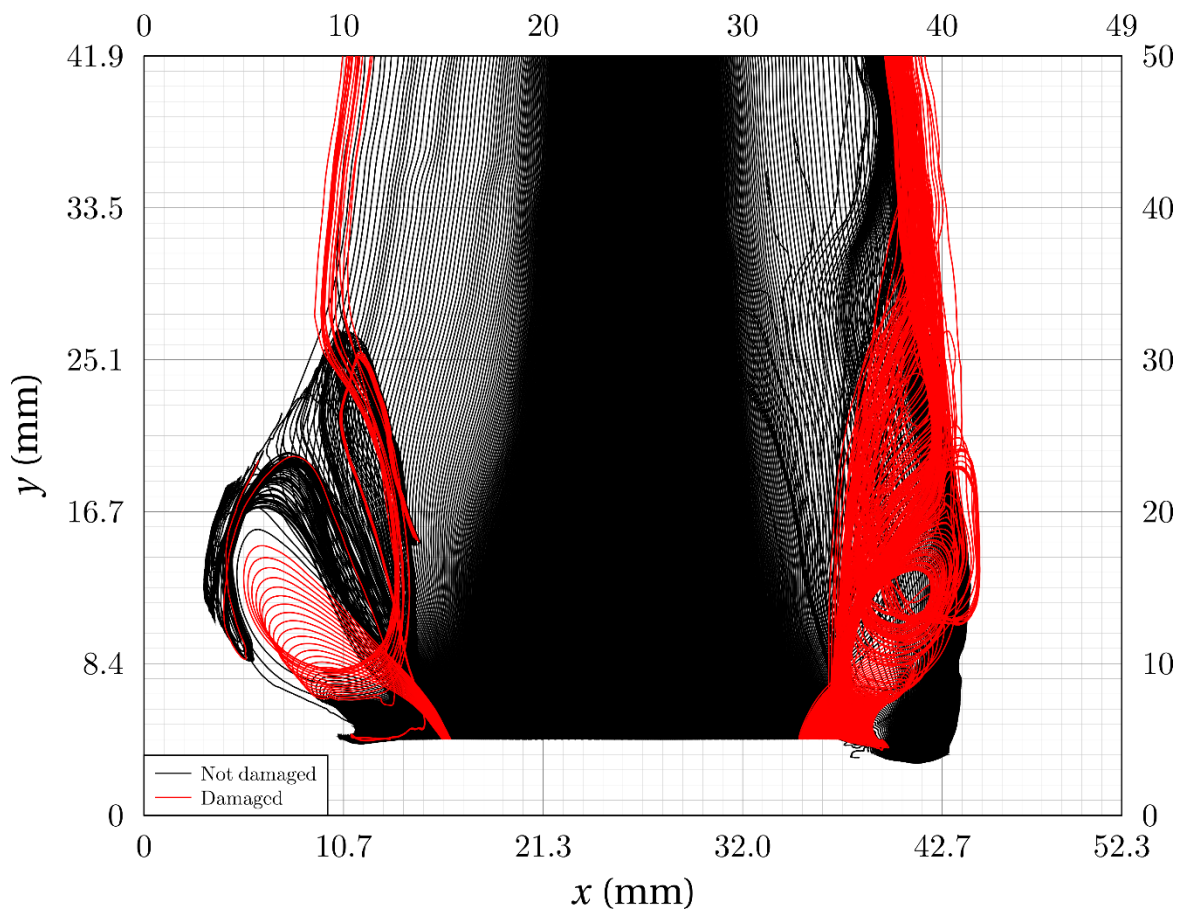


Figura 4.7. Traiettorie compiute dalle RBCs attraverso la BMHV ottenute utilizzando il Rupture Model. In rosso sono evidenziate le traiettorie per cui le RBCs hanno subito danno; in nero tutte le altre.

Osserviamo per prima cosa le strutture del flusso:

1. Le tensioni accumulate dalle RBCs al passaggio attraverso la valvola, durante la fase sistolica, mostrano come le regioni in cui le cellule sono soggette a sforzi maggiori sono localizzate in prossimità dei lembi e nelle zone di strato limite, oltre che nei seni di Valsalva. Questo aspetto è in pieno accordo con le conoscenze che si hanno sul comportamento del flusso attraverso la BMHV e trovano riscontro con dati presenti in studi autorevoli di letteratura [37, 38]. Shahriari nel 2012 [38], mediante calcolo numerico (SPH), ha ottenuto una mappa 2D delle tensioni accumulate dalle cellule in fase sistolica: dal confronto con i risultati del RM (figura 4.8) si osserva che, in entrambi, i picchi di tensione della medesima entità si registrano nelle stesse zone.
2. Il comportamento vorticoso delle traiettorie registrato dal RM nelle regioni dei seni di Valsalva, osservabile in figura 4.7, simula bene il comportamento reale del flusso attraverso

una BMHV [37]. Queste zone vorticose sono anche le regioni in cui si registrano gli sforzi accumulati più elevati durante il singolo passaggio, sia per le tensioni più elevate registrate in queste zone, sia per il tempo di esposizione maggiore (come si è detto sopra).

Il comportamento del flusso attraverso una BMHV è quindi descritto in modo adeguato dal Rupture Model.

Viene ora proposta un'analisi di sensibilità sui parametri costitutivi del modello meccanico di membrana, volta ad osservare anzitutto quanto esso è robusto al variare del valore dei parametri. La soglia di rottura fragile locale λ_l , fatta variare all'interno del range $2.0 \div 2.4$ [29], è sicuramente il principale fattore che modifica il comportamento della RBC. Il parametro λ_g *non ha mostrato influenza nel computo di HI totale in quanto la rottura totale della cellula non si è mai verificata in maniera istantanea*. Aiutandosi con le figure 4.9 e 4.10 si possono fare le seguenti osservazioni:

- Il tempo necessario al raggiungimento del livello critico di emolisi $HI = 0.5\%$ [4] varia esponenzialmente in relazione ad un incremento lineare di λ_l : si passa da un $T = 30$ s impostando $\lambda_l = 2$, fino ad una situazione di assenza di danno nel caso di $\lambda_l = 2.4$, come si può vedere in figura 4.9. La forma delle curve ottenute dal modello rimane la medesima al variare del parametro in questione rendendo quindi la risposta robusta a variazioni anche importanti della soglia locale di danno.
- Al variare della soglia le aree dove il danno viene accumulato rimangono pressoché le stesse, un'ulteriore prova della robustezza del modello e della buona compatibilità tra analisi numerica e sperimentale.

Il valore scelto all'interno del RM per la soglia di deformazione locale ($\lambda_l = 2.35$) è quello che momentaneamente avvicina maggiormente il modello alla realtà fisiologica, fittando i dati sperimentali con parametri idrodinamici controllati ottenuti da Zhang su RBCs reali [10]. Tale limite esprime una deformazione massima tollerata dall'areola superficiale δA dell'RBC pari al 270%, in linea con quanto avviene nella realtà; è poi un valore, tra quelli testati, dal quale deriva un tempo ragionevole per il raggiungimento di $HI = 0.5\%$ (con $G = 5 \cdot 10^{-6} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$): aumentando λ_l non si riscontra alcun danno, diminuendolo l'emolisi diventa critica in tempi troppo ridotti.

Il modulo di taglio G è stato impostato al valore più basso tra quelli presenti in letteratura, come condizione di sicurezza per evitare di sottostimare la rottura delle RBCs; al crescere di G

(mantenendo costante la soglia per il danno locale) si dilata il tempo necessario al raggiungimento della soglia critica di emolisi (figura 4.10).

Un'ulteriore conferma della bontà del modello e dei parametri costitutivi scelti arriva dal confronto dei risultati numerici ottenuti con il RM con i risultati da esperimenti diretti sulle RBCs eseguiti *in-vitro* in viscosimetro di Couette [10], visibile in figura 4.11. In questo studio l'autore ha utilizzato un indice emolitico di tipo PW.

Si nota come a regime il RM sia in linea con i dati di letteratura, a prova del fatto che il modello è stato formulato in modo corretto. Il comportamento a gradino nel transitorio del RM è una conseguenza del criterio di rottura fragile utilizzato e dell'adozione di un singolo tempo di rilassamento per la membrana.

Ulteriori spunti per affinare il modello.

Anche nel Rupture Model, come in ogni modello numerico, sono state eseguite alcune semplificazioni della realtà più o meno stringenti. A partire da queste si cerca ora di esprimere quali potrebbero essere gli accorgimenti da attuare per un affinamento del modello verso la realtà fisica del processo emolitico:

- La quasi totalità degli studi sugli indici emolitici condotti in letteratura utilizzano dati da esperimenti eseguiti *in-vitro*. Anche i dati utilizzati per costruire il campo delle velocità per il RM derivano da esperimenti di questo tipo [26]. Nonostante la bontà del campo realizzato, test più precisi ed in condizioni fluidodinamiche variabili possono essere condotti così da osservare la risposta del modello ad un campo dinamico variabile da ciclo a ciclo (sempre in range fisiologico). Una via ulteriore, ma complessa per ovvie ragioni, è quella di poter disporre di dati da esperimenti *in-vivo*.
- L'ottenimento di una eterogeneità cellulare all'interno della popolazione iniettata è stato semplificato, come si è detto nel Paragrafo 4.2.2, ricorrendo ad uno stratagemma geometrico: gli ellissoidi utilizzati sono uno diverso dall'altro in dimensioni (semiassi a , b e c diversi per ognuna delle N particelle). Questa semplificazione non è del tutto convincente dal punto di vista concettuale. Più che una sola differenziazione di forma, la diversità risiede nei parametri costitutivi del modello meccanico di membrana. Ma non solo: è molto probabile che le RBC più anziane contengano una quantità di emoglobina che si discosta

molto dalla media (30 pg). Bisogna dunque fare chiarezza sulla questione tentando di reperire informazioni di tipo biologico sulla risposta a fatica delle cellule nel corso della loro vita, introducendo un modello di invecchiamento.

- L'ellissoide "RBC" è stato iniettato e mantenuto allineato con la direzione del flusso; l'azione del campo delle tensioni esterne non modifica questa condizione e le cellule continuano a restare "ancorate" a questa posizione. Nella realtà le RBCs ruotano anche su loro stesse principalmente attorno all'asse ortogonale al flusso (movimento a carattere oscillatorio).
- Le particelle che attraversano la BMHV nel RM sono le uniche componenti corpuscolate del campo fluido. Nella realtà le RBCs si scontrano sia tra loro che con altre cellule, come le piastrine e i macrofagi. Dunque il campo delle tensioni reale potrebbe risultare diverso, e da questo la stima di HI. Questo aspetto potrebbe essere studiato disponendo di dati *in-vivo* i quali contengono di per sé al loro interno queste informazioni.
- Il citoplasma è stato modellato per semplicità come incomprimibile e privo di moto. L'incomprimibilità è accettabile dal punto di vista concettuale: la pressione interna ed esterna alla cellula possono essere considerate la medesima essendo la membrana estremamente sottile. Per quanto riguarda il secondo aspetto sappiamo da studi di letteratura che esiste un movimento reciproco tra membrana e liquido citoplasmatico di tipo tank-treading [32], per il quale esistono già diversi modelli matematici. Potrebbe essere interessante tenerne conto in futuro, cercando di inserire in maniera adeguata questo aspetto nel modello meccanico per la singola RBC.

Descritti gli aspetti di affinamento del modello, nel prossimo capitolo vengono mostrati alcuni aspetti biologici reali del processo emolitico che non sono stati introdotti in questa prima formulazione del Rupture Model.

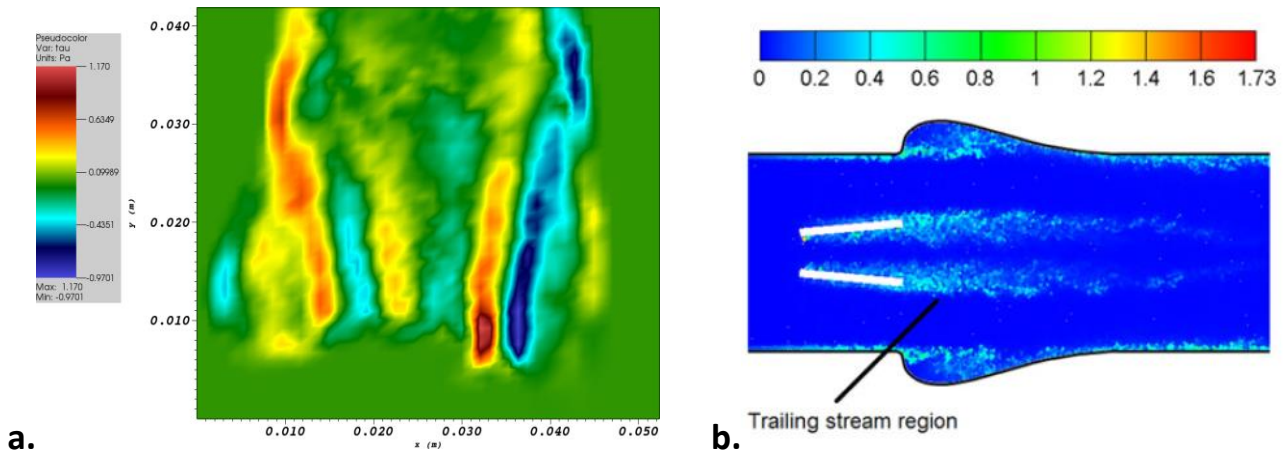


Figura 4.8. Confronto tra: **a)** il campo di tensioni ottenuto mediante esperimento *in-vitro* [26] utilizzato per la validazione del RM e **b)** il campo di tensioni ottenuto per via numerica presente in letteratura [38]. Si tenga presente che: i valori delle tensioni in a) hanno segno diverso a seconda delle direzioni; nelle simulazioni in b) i leaflets della valvola vengono simulati numericamente come immobili.

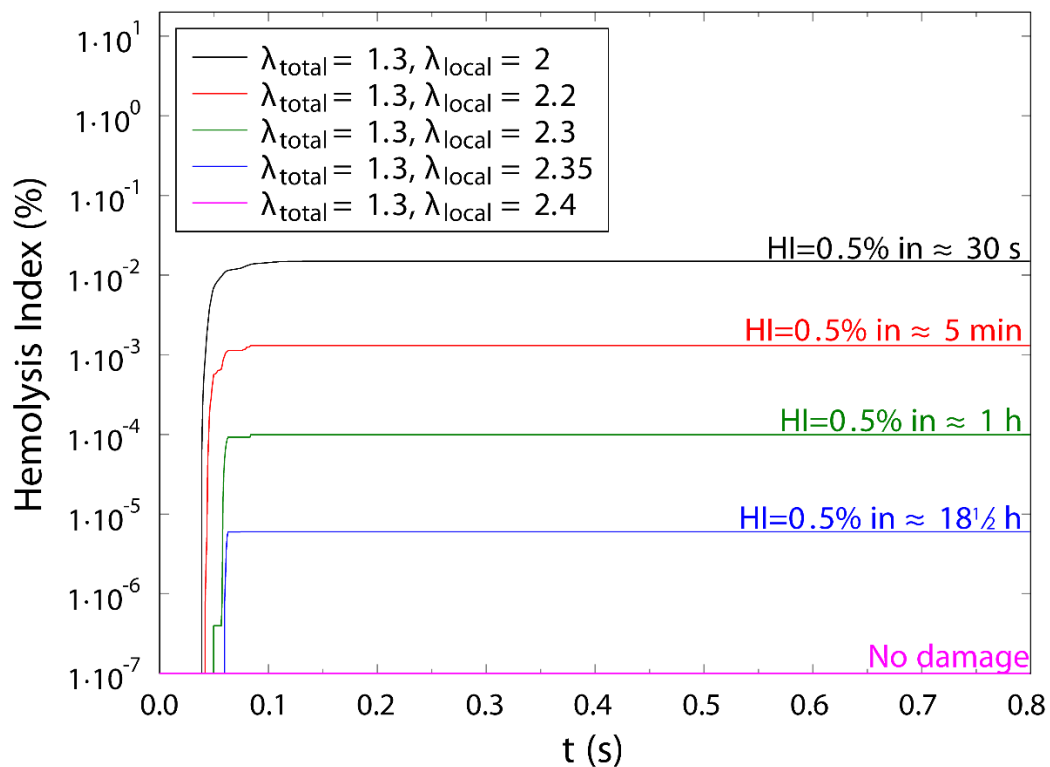


Figura 4.9. HI = 0.5% ottenuto in tempi diversi in relazione al cambiamento del parametro λ_l , mantenendo costante il modulo di taglio $G = 5 \cdot 10^{-6}$ N/m.

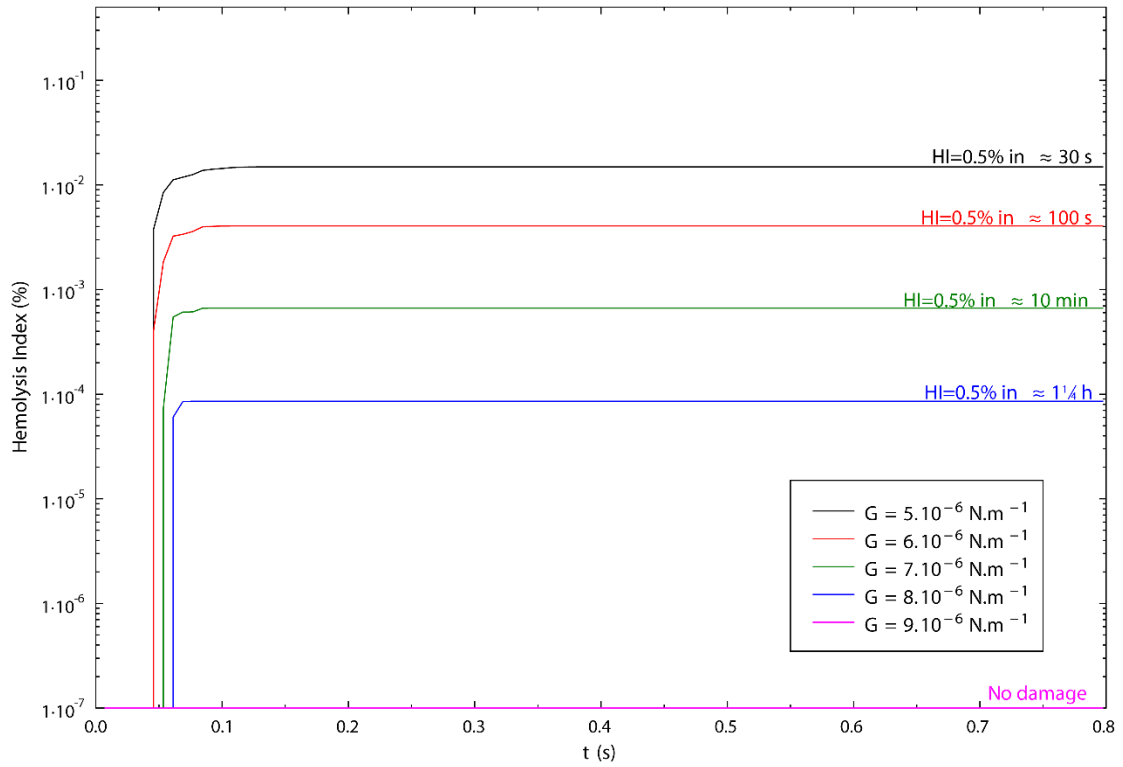


Figura 4.10. HI = 0.5% ottenuto in tempi diversi in relazione al cambiamento del parametro G , mantenuto costante λ .

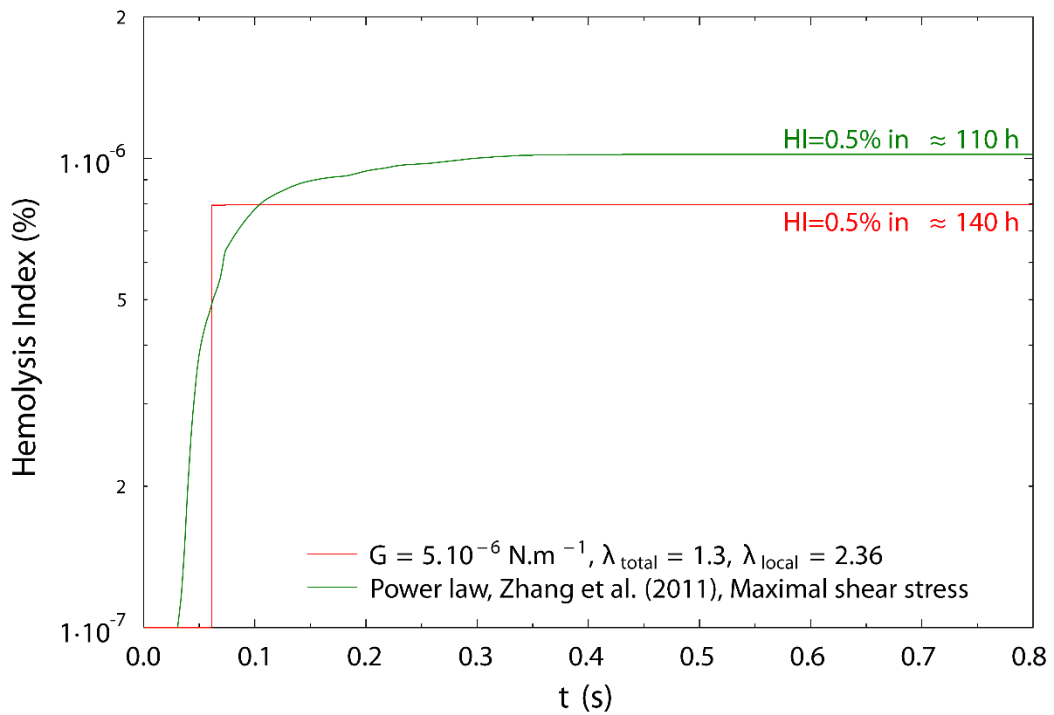


Figura 4.11. Confronto tra HI ottenuto con il RM e HI ottenuto da Zhang con approccio PW [10].

5

Implementazioni future del modello

Questo lavoro di tesi ha messo in luce come il Rupture Model sia concepito in modo diametralmente opposto alla consueta formula analitica caratteristica delle power law. La sua forza è di contenere parametri fisici vicini alla realtà fisiologica di una RBC immersa nel torrente circolatorio, e saperne descrivere la dinamica. I due punti chiave sono stati:

- Partire da leggi fisiche e non da leggi empiriche di derivazione sperimentale. Adottare una metodologia accoppiata: campo sperimentale ed iniezione numerica di particelle passive, ottenendo così anche l'informazione spaziale, specifica per singola protesi.
- Stimare la quantità di emoglobina liberata dalla rottura di una RBC proporzionalmente alla dimensione della superficie danneggiata, con una preliminare legge fragile ma che avvicina i risultati di simulazione a quelli degli esperimenti *in-vitro* più recenti.

In questo capitolo si descrivono alcuni aspetti, legati in particolare all'emolisi, che in futuro potrebbero essere tenuti in considerazione nel miglioramento del modello. Nel primo paragrafo viene descritto il ruolo dell'aptoglobina, una proteina direttamente coinvolta nel processo emolitico. Viene inoltre proposto un parametro che tenga conto del suo contributo all'interno della formulazione dell'indice emolitico HI del Rupture Model. Nel secondo paragrafo vengono riportati alcuni aspetti e conseguenze dell'emolisi già in parte studiati in letteratura, come il ruolo delle piastrine (PLs), ed i fenomeni di aggregazione e trombosì.

5.1 – IL RUOLO DELL'APTOGLOBINA

L'organismo umano è dotato di processi di feedback che attiva in seguito a stimolazioni esterne, molto spesso volti a contenere possibili danni ai diversi organi. Un esempio esplicativo è il

seguinte: in seguito ad un picco glicemico, il pancreas reagisce liberando insulina che interviene accelerando il consumo di glucosio da parte degli organi insulino-dipendenti, abbassando la glicemia sino a livello basale. Un fenomeno simile, ma che interessa altre molecole, si realizza in presenza di emolisi.

Infatti, quando la membrana delle RBCs si rompe (o si danneggia parzialmente), la cellula libera nel sangue l'emoglobina (*Hb*) e questa fuoriuscita viene come visto parametrizzata per stimare l'HI di un dispositivo. L'emoglobina, essenziale per il trasporto dell'ossigeno effettuato dalle RBCs, è però nociva per l'organismo quando si trova disciolta nel sangue in quantità non fisiologiche. In tal caso l'organismo reagisce aumentando localmente la concentrazione del suo antagonista: l'**aptoglobina** (*Hp*). Quest'ultima è in grado di legare in un complesso *Hb-Hp* l'emoglobina in eccesso, inattivandola. Bisogna sottolineare il fatto che questo fenomeno avviene ben prima del raggiungimento della soglia critica dell'emolisi, HI = 0.5% [4]. Teoricamente avviene ogni qualvolta si superi la soglia fisiologica di emoglobina libera nel sangue, ovvero è un processo che avviene quando:

$$Hb_{FREE} > Hb_0 \approx 0.05 \text{ mg/L}$$

con Hb_{FREE} emoglobina libera nel sangue, Hb_0 livello basale di emoglobina libera nel sangue.

Appare chiaro come anche la concentrazione di aptoglobina libera nel sangue, visto il suo chiaro legame con il processo emolitico, possa essere indirettamente utilizzata in clinica per la valutazione dell'entità dell'emolisi.

A livello basale, in un individuo normale, la concentrazione di *Hp* si colloca tra gli 0.3 e i 2.0 g/L (alta variabilità); questa riesce a legare una quantità di emoglobina fino a circa 1.5 g/L. Viene dichiarata emolisi quando il livello di *Hp* libera si porta al di sotto della *soglia critica* di **0.1 g/L** (a volte in presenza di emolisi si riscontrano valori nulli di *Hp*). Un livello basso di *Hp* libera infatti sta a significare che questa è impegnata nel formare il complesso *Hb-Hp*, ovvero che è in atto un processo emolitico.

In tabella 5.1 vengono riassunti i parametri di concentrazione in diverse situazioni per aptoglobina ed emoglobina, ricavati dalla letteratura [40, 41, 42].

Parametro	Simbolo	Valore e riferimento
Livello basale di aptoglobina libera nel sangue	Hp_0	0.3-2.0 g/L (Nagel)
Livello massimo di emoglobina legata dall'aptoglobina	$HbHp_{max}$	1.5 g/L (Nagel)
Soglia critica di aptoglobina per la valutazione dell'emolisi	Hp_{CR}	< 0.1 g/L (Shioi, Warnes)

Tabella 5.1. Parametri di concentrazione per l'aptoglobina.

Senza considerare quanta emoglobina libera nel sangue l'aptoglobina riesce a legare, non si rischia di sovrastimare l'HI?

La soglia per gli indici emolitici utilizzata finora è quella di $HI = 0.5\%$, direttamente collegata alla soglia clinica di $Hb_E = 0.3-0.6 \text{ g/L}$ (si riveda il Capitolo 2). Quest'ultima è ricavata osservando direttamente il dato sulla concentrazione effettiva di Hb nel campione di sangue ottenuto in seguito a prelievo. È lecito supporre che l'aptoglobina sia già intervenuta a legare parte dell'emoglobina al momento del prelievo; questo dato di concentrazione quindi non è più direttamente collegato al numero di RBCs danneggiate, ma semmai alla quantità di emoglobina che l'aptoglobina non è riuscita a legare.

Nella formulazione del Rupture Model noi siamo già a conoscenza di quante RBCs sono state danneggiate (indice M nella sommatoria $\sum_{i=1}^M Hb_{free}^{RBC}(i)$). A partire poi dalla conoscenza di quanta superficie cellulare si è danneggiata per ognuna delle M particelle, è diretto il calcolo della quantità di Hb liberata nel sangue che viene utilizzata per il calcolo dell'HI. In sostanza appare chiaro che senza considerare il ruolo dell'aptoglobina si rischia di *sovrastimare la variazione di emoglobina libera nel sangue* (ΔHb). Una volta note la cinetica di Hp e la sua concentrazione nel sangue, questo parametro potrebbe essere inserito con intelligenza come fattore sottrattivo all'interno del calcolo di ΔHb nel Rupture Model:

$$\Delta Hb = \left(\sum_{i=1}^M Hb_{free}^{RBC}(i) \right) - Hb_{Hp}$$

con Hb_{Hp} quantità di emoglobina legata e inattivata dall'aptoglobina. Nel Paragrafo 5.1.2 viene presentata una prima legge di stima per questo parametro.

La cinetica di Hp per la stima di Hb_{Hp} .

L'aptoglobina non viene secreta al momento del bisogno, ma è già presente all'interno del sangue anche prima dell'avvento del processo emolitico. In letteratura non esistono dati certi e precisi sulla cinetica di questa proteina; a nostro avviso si dovrebbe ricorrere a misure *in-vivo* in condizioni controllate. Le variabili in gioco sono infatti numerose: concentrazione, velocità di richiamo, velocità e modalità di secrezione di nuova Hp . In letteratura sono presenti diversi esperimenti *in-vitro* [42, 43], condotti osservando campioni di sangue in cui sono state disciolte concentrazioni variabili di Hb e di Hp . Nagel nel 1970 [43] ha studiato in tal modo la formazione del complesso $Hb-Hp$, arrivando a due conclusioni:

- L'aptoglobina non si lega direttamente con la molecola di emoglobina, ma con i dimeri di questa; prima della formazione del complesso avviene quindi una scissione dell'emoglobina nelle sue catene α e β , con un certo *tempo fisiologico*;
- Nagel ha stimato la velocità di formazione del complesso, utilizzando un rapporto stechiometrico 1:1, in una **constant rate** $K = 5.5 \cdot 10^5 M^{-1} sec^{-1}$ (con $M = mol/L$). Secondo Nagel il processo avviene a velocità costante, con l'ipotesi che fino a quando questa molecola è presente la sua capacità di legare Hb rimane teoricamente inalterata.

I risultati ottenuti da Nagel sembrano per ora non trovare opposizioni in letteratura. Bisogna sottolineare il fatto che "osservare" un campione in cui si trovano già disciolte emoglobina e aptoglobina è concettualmente molto lontano dalla condizione reale in cui le concentrazioni di entrambe le sostanze hanno una notevole variabilità; non dimentichiamo poi la velocità di richiamo di Hp e le variabili legate alla sua produzione *ex novo* in caso di necessità.

Come (e se) inserire questo aspetto nella valutazione di HI?

Per essere data una risposta concreta a questa domanda lo studio a riguardo deve essere sicuramente approfondito. Per ora, si ritiene solamente di dare alcuni spunti per indirizzare la ricerca successiva. Anzitutto, la condizione di presenza di device protesico altera la fisiologia e dinamica del flusso naturale: in questi casi il processo emolitico cui il corpo è sottoposto, seppur non grave, non è un fenomeno isolato, bensì continuo e costante. I valori di concentrazione di aptoglobina devono essere rivisti alla luce di questo dato.

Shioi e Warnes [40, 41] riportano in tal senso un risultato interessante: i portatori di valvole cardiache meccaniche presentano una concentrazione di aptoglobina libera nel sangue sempre al di sotto della soglia 0.1 g/L, per il suo continuo legarsi all'emoglobina. Gli autori affermano quindi come questo parametro in questo caso non possa essere direttamente utilizzato in clinica per valutare la presenza di un fenomeno emolitico, diverso da quello dovuto alla valvola.

Tale tesi sembra comunque troppo restrittiva, un valore così basso di concentrazione di Hp libera in portatori di valvola cardiaca potrebbe non essere dovuto solamente alla formazione del complesso *Hb-Hp*. Le cellule epatiche responsabili della produzione di aptoglobina, sottoposte ad uno stress cronico, potrebbero non essere più in grado di adempiere a dovere al loro compito. In tal caso il rilascio di Hp sarebbe in quantità molto ridotte e non sufficienti a contrastare l'emolisi. Se questa ipotesi fosse verificata, l'aptoglobina potrebbe venire esclusa dal nostro modello.

5.1.1 – Calcolo di alcuni parametri legati all'aptoglobina

Partendo dai dati di letteratura si propone un modello iniziale di cinetica per l'aptoglobina

Rapporto tra *Hb* e *Hp* nel complesso *Hb-Hp*.

Nell'unità di volume, il valore massimo di aptoglobina presente e il valore massimo di emoglobina legata sono sempre in rapporto 4:3. Tale relazione trova spiegazione nell'osservazione dei pesi molecolari (*MW = Molecular Weight*) delle due proteine nel complesso *Hb-Hp*. Una molecola di Hp ha peso molecolare di 89 kDa, mentre una molecola di Hb è pari a 66 kDa, per un rapporto tra i due di **4:3** e per un peso totale del complesso *Hb-Hp* (1:1) di 155 kDa.

Massa di Hb legata al secondo.

Partendo dalla *constant rate* $K = 5.5 \cdot 10^5 \text{ [M}^{-1} \text{ sec}^{-1}]$ di Nagel [43], ovvero la velocità con cui Hb viene legata, possiamo calcolare quanti grammi di emoglobina vengono legati al secondo:

$$moli_{Hb} = M \cdot L = (5.5 \cdot 10^5)^{-1} = 1.82 \cdot 10^{-6} \text{ [mol]}$$

$$g_{Hb} = moli_{Hb} \cdot MW_{(Hb)} = 1.82 \cdot 10^{-6} \cdot 66000 = \mathbf{0.12} \text{ [g/L/sec]}$$

con $moli_{Hb}$ moli di Hb legata (ricordando che $M = \text{mol/L}$), g_{Hb} grammi di Hb legata al secondo (ricordando $\text{mol} = \text{g}/MW_{(Hb)}$), $MW_{(Hb)}$ peso molecolare dell'emoglobina ($MW_{(Hb)} = 66 \text{ kDa}$).

Alla luce di questo risultato possono essere fatte le seguenti considerazioni:

- In un litro di sangue si ha un valore massimo di concentrazione di aptoglobina pari a 2.0 g, capaci di legare 1.5 g di emoglobina: ciò significa che al massimo in **13 secondi** viene saturata tutta l'aptoglobina disponibile;
- Avvalendosi del rapporto 4:3 tra le due proteine nel complesso, si può ricavare quanta aptoglobina viene saturata al secondo: $\mathbf{0.12 \cdot 4 : 3 = 0.16 \text{ [g/L]}}$;
- In presenza di device cardiovascolare si registra una concentrazione massima di Hp pari a 0.1 g/L [40, 41], ovvero verrebbero legati al massimo 0.075 g/L di emoglobina (sempre avvalendoci del rapporto 4:3 esistente tra le due proteine), motivo per il quale seguendo l'approccio di Shioi si potrebbe trascurare questo parametro nella stima dell'HI. Ma probabilmente il significato ed il ruolo della molecola non risiedono nella risposta impulsiva ad un bolo esterno, ma alla risposta lenta dovuta ad un evento cronico, da analizzare con tecniche diverse.

5.1.2 – Prima stima del parametro Hb_{Hp}

Partendo dall'ipotesi che almeno in parte l'emoglobina libera nel sangue (dopo un evento di emolisi) venga legata e inibita dall'aptoglobina, cerchiamo di modificare opportunamente il termine ΔHb all'interno del Rupture Model per tenerne conto.

Si procede nel modo seguente:

- Il dato sulla concentrazione di Hp viene ridimensionato al volume di riferimento (V_{ref}):

$$Hp = \frac{Hp_0}{V_{tot}} \cdot V_{ref}$$

con Hp_0 livello basale di aptoglobina libera nel sangue.

- La quantità di Hb legata è in rapporto 3:4 con la quantità di Hp presente nel volume di riferimento, cioè:

$$Hb_{Hp} = \frac{Hp}{4} \cdot 3$$

A questo punto si può inserire il fattore sopra calcolato come termine sottrattivo all'emoglobina libera:

$$\Delta Hb = \left(\sum_{i=1}^M Hb_{free}^{RBC}(i) \right) - Hb_{Hp}$$

Da notare come, per questa prima stima, non si sono tenuti in considerazione molteplici aspetti legati alla reale cinetica dell'aptoglobina, come la velocità di richiamo.

5.2 – ALTRI ASPETTI BIOLOGICI LEGATI ALL'EMOLISI

Come si è ampiamente visto, l'emolisi non è un fenomeno isolato ma un processo che coinvolge molteplici corpuscoli presenti nel sangue e dal quale possono conseguire svariati altri meccanismi. Basti considerare che quando una RBC si rompe non rilascia nel sangue solo una certa quantità di emoglobina, ma libera anche alcuni fattori di coagulazione che attivano il richiamo piastrinico.

In letteratura sono stati osservati alcuni di questi aspetti con particolare attenzione al comportamento delle piastrine; i modelli matematici realizzati, però, non sono mai stati inseriti

all'interno di un modello emolitico, ma piuttosto all'interno di indici per valutare fenomeni di trombosi.

Proviamo dunque a descrivere una *linea del tempo* dell'emolisi, semplificata ma capace di coglierne le diverse sfaccettature principali:

- **Tempo zero:** rottura locale della membrana di una RBC.
- **Fenomeni** riscontrabili **negli istanti immediatamente successivi** alla rottura: liberazione di emoglobina (δHb), di determinati fattori di richiamo e attivazione piastrinica (*fattore di von Willebrand*), esposizione al torrente circolatorio di alcuni lipidi del monostrato interno della membrana (*PS*) di richiamo e riconoscimento per i macrofagi.
- **Fenomeni locali** riscontrabili **nel breve termine:** formazione del complesso *Hb-Hp* e conseguente inattivazione dei fenomeni ossidativi dell'emoglobina ad opera dell'aptoglobina (*Hp*), arrivo in loco delle piastrine (PLs), fagocitazione degli schistociti (frammenti delle RBCs rotte) ad opera dei macrofagi.
- **Fenomeni locali e distali** riscontrabili **nel lungo termine:** se l'emolisi non è dovuta ad una vera ferita ma alla presenza di un device protesico cardiovascolare come una valvola cardiaca BMHV, con molta probabilità le PLs richiamate hanno concorso alla formazione di piccoli coaguli con alcuni frammenti di RBCs sfuggiti ai macrofagi; questi coaguli, liberi di viaggiare nel torrente circolatorio, possono avere conseguenze anche in regioni distali (ischemie).

Quali sono gli aspetti importanti da considerare in un modello di attivazione e aggregazione piastrinica?

Le piastrine allo stato dormiente, ovvero non attivato, circolano nel sangue liberamente senza aggregarsi e senza aderire alle pareti dei vasi; quando vengono attivate dai fattori di coagulazione viene alterata la loro superficie esterna e la loro forma: da rigide e discoidali diventano deformabili e sferiche.

Un modello matematico che descrive questo fenomeno deve tenere in considerazione diversi elementi [44]:

- L'interazione con il fluido: le PLs come le RBCs sono soggette a sforzi tangenziali e vengono danneggiate da questi, se si verificano oltre una certa soglia per un tempo prolungato;
- Piastrine attivate e non attivate: un modello comportamentale delle PLs deve poter descrivere entrambi i comportamenti essendo presenti nel flusso entrambe le tipologie di PLs contemporaneamente;
- Fattori di attivazione e di richiamo: deve essere descritta la cinetica del processo di richiamo e di attivazione;
- Le pareti del vaso: le PLs interagiscono con la parte corpuscolata del sangue, ma aderiscono anche (nello stato attivato) alla parete.

Perché nella valutazione di un indice HI siamo interessati anche al ruolo delle piastrine?

Poter accoppiare il Rupture Model ad un modello matematico di aggregazione ed attivazione delle piastrine, rientra nell'ottica di valutare non solo l'impronta emolitica di un device protesico, ma anche di prevedere quelli che sono i suoi effetti tromboembolici. In questo si realizzerebbe un modello di valutazione completa delle prestazioni di un impianto: si otterrebbero dati preliminari sul suo impatto emolitico locale accoppiati alla sua azione di danno distale globale.

C

Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono state seguite passo dopo passo le diverse fasi di realizzazione della prima formulazione del Rupture Model, con l'obiettivo di evidenziare come questo tipo di approccio, rispetto al consolidato metodo power law, dia una descrizione diversa e maggiormente fisiologica del processo emolitico dovuto alla presenza di un device protesico.

Gli indici emolitici HI al momento presenti in letteratura soffrono di alcuni limiti legati principalmente alla loro formulazione matematica ed alle loro deboli basi fisiche: cercano di collegare risultati da esperimenti con condizioni non fisiologiche (flusso ricreato in-vitro con viscosimetro di Couette) ad un fenomeno fisiologico estremamente complesso, sia dal punto di vista meccano-idraulico che biologico.

Per bypassare questi limiti si è deciso di partire da zero creando un nuovo modello; l'idea di base che ha accompagnato ogni fase del lavoro, dalla valutazione delle fonti di letteratura alle scelte per le leggi costitutive, è stata quella di rispettare la fisio-bio-logia reale del processo, mediante lo studio e la quantificazione di tutti i fenomeni che concorrono ad aumentare il rischio emolitico, partendo innanzitutto da un campo dinamico fisicamente rispondente e fisiologicamente descrittivo.

I risultati hanno dimostrato che il modello è robusto e descrive in modo accurato il flusso osservato attraverso una BMHV, caso specifico preso in esame in questo lavoro. Il Rupture Model, al contrario degli HI power law, permette inoltre numerose informazioni aggiuntive "in uscita": si conoscono le traiettorie di danno, e dunque si ha un'informazione spaziale. Si possono seguire contemporaneamente migliaia di particelle per centinaia di migliaia di cicli. Questa informazione spaziale sul danno è un risultato notevole del modello, e può essere davvero utile nella realizzazione di migliorie sul dispositivo volte a ridurre l'impronta emolitica.

Il modello, presentato qui nella sua "prima versione", soffre ancora di alcune semplificazioni della realtà inevitabili al momento. Ricordiamo ad esempio la semplificazione del fattore età delle

cellule ad un aspetto geometrico, la non rotazione del globulo al di fuori del piano di indagine 2D, ed infine l'inserimento di una rottura "fragile" e non a partire dalla storia di carico subita dalla RBC.

In conclusione, è evidente come il Rupture Model sia il primo modello fisicamente basato capace di catturare l'entità dell'emolisi non solo mediante un valore percentuale e nella sola dimensione temporale del processo (power law), ma con una serie di informazioni aggiuntive che permettano una visione più ampia del problema, sia nell'ottica di aiuto post operatorio clinico che nella progettazione di device a minor impatto sulla parte corpuscolata.

B

Bibliografia

1. Susin FM. *Corso di Fluidodinamica per la Bioingegneria – Raccolta di appunti delle lezioni*. Laurea Magistrale in Bioingegneria, A.A. 2010-2011, pp 17-21, 81-84.
2. Dasi LP, Simon HA, Sucosky P, Yoganathan AP. *Fluid Mechanics of Artificial Heart Valves*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2009; 36, 225-237.
3. Chandran K, Rittgers S, Yoganathan A. *Biofluid Mechanics: The Human Circulation*. CRC Press, Boca Raton 2006.
4. Lippi G, Salvagno GL, Blanckaert N, Giavarina D, Green S, Kitchen S, Palicka V, Vassault A, Plebani M. *Multicenter Evaluation of the Hemolysis Index in Automated Clinical Chemistry Systems*. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 934-939.
5. Suter SP, Mehrjardi MH. *Deformation and Fragmentation of Human Red Blood Cells in Turbulent Shear Flow*. *Biophysical J* 1975; 15: 1-10.
6. Paul R, Apel J, Klaus S, Schügner F, Schwindke P, Reul H. *Shear Stress Related Blood Damage in Laminar Couette Flow*. *Artif Organs* 2003; 27: 517-529.
7. Goubergrits L., Affeld K. *Numerical Estimation of Blood Damage in Artificial Organs*. *Artif Organs* 2004; 28: 499-507.
8. Heuser G, Opitz R. *A Couette Viscometer for Short Time Shearing of Blood*. *Biorheology* 1980; 17: 17-24.
9. Wurzinger LJ, Opitz R, Eckstein H. *Mechanical Bloodtrauma. An Overview*. *Angeiologie* 1986; 38: 81-97.
10. Zhang T, Taskin ME, Fang HB, Adam Pampori, Jarvik R, Griffith BP, Wu ZJ. *Study of Flow-induced Hemolysis Using Novel Couette-type Blood Shearing Devices*. *Artif Organs* 2011; 35: 1180-1186.

11. Giersiepen M, Wurzinger LJ, Opitz R, Reul H. *Estimation of Shear Stress-related Blood Damage in Heart Valve Prostheses—in vitro Comparison of 25 Aortic Valves*. Int J Artif Organs 1990; 13: 300-306.
12. Taskin ME, Fraser KH, Zhang T, Wu C, Griffith BP, Wu ZJ. *Evaluation of Eulerian and Lagrangian Models for Hemolysis Estimation*. ASAIO J 2012; 363-372.
13. Arora D, Behr M, Pasquali M. *A Tensor-based Measure for Estimating Blood Damage*. Artif Organs 2004; 28: 1002-1015.
14. De Tullio MD, Namc J, Pascazio G, Balaras E, Verzicco R. *Computational Prediction of Mechanical Hemolysis in Aortic Valved Prostheses*. European J of Mechanics B/Fluids 2012; 35: 47-53.
15. Grigioni M, Morbiducci U, D’Avenio G, Di Benedetto G, Del Gaudio C. *A Novel Formulation for Blood Trauma Prediction by a Modified Power-law Mathematical Model*. Biomech Model Mechanobiol 2005; 4: 249-260.
16. Kim Y, Kim K, Park Y. *Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances*. “Blood Cell – An Overview of Studies in Hematology”, Moschandreu T, InTech 2012, pp 167-194.
17. Evans EA, Hochmuth RM. *Membrane Viscoelasticity*. Biophysical J 1976; 16: 1-11.
18. Hochmuth RM, Worthy PR, Evans EA. *Red Cell Extensional Recovery and the Determination of Membrane Viscosity*. Biophysical J 1979; 26: 101-114.
19. Bagchi P, Johnson PC, Popel AS. *Computational Fluid Dynamic Simulation of Aggregation of Deformable Cells in a Shear Flow*. Transactions of the ASME 2005; 127: 1070-1080.
20. Zhang J, Johnson PC, Popel AS. *Red Blood Cell Aggregation and Dissociation in Shear Flows Simulated by Lattice Boltzmann Method*. J of Biomech 2008; 41: 47-55.
21. Zhang J, Johnson PC, Popel AS. *Effects of Erythrocyte Deformability and Aggregation on the Cell Free Layer and Apparent Viscosity of Microscopic Blood Flows*. Microvascular Research 2009; 77: 265-272.
22. Skalak R, Tozeren A, Zarda RP, Chien S. *Strain Energy Function of Red Blood Cell Membranes*. Biophysical J 1973; 13: 245-264.
23. Waugh RE, Evans EA. *Thermoelasticity of Red Blood Cell Membrane*. Biophysical J 1979; 26: 115-132.
24. Waugh RE, Hochmuth, RM. *Mechanics and Deformability of Hematocytes*. “The Biomedical Engineering Fundamentals” 3rd ed, Bronzino JD, CRC Press 1995, pp 60-63.

25. Chien S, Sung KP, Skalak R, Usami S, Tozeren A. *Theoretical and Experimental Studies on Viscoelastic Properties of Erythrocyte Membrane*. Biophysical J 1978; 24: 463-487.
26. Fortini S, Espa S, Toninato R, Pacetti L, Querzoli G, Susin MF, Cenedese A. *Analysis of the Flow Field Downstream a Bileaflet Valve inside an Aortic Arch Laboratory Model*. 16th Int Symp on Applications of Laser Techniques to Fluid Mechanics. Lisbon Portugal, 9-12 July 2012.
27. Susin FM, Toninato R, Espa S, Fortini S, Querzoli G, Fadda G. *La Tendenza al Danno Emolitico in una Protesi Valvolare Bileaflet*. XXXIV Convegno Nazionale di Idraulica e Costruzioni Idrauliche - IDRA14. Bari Italy, 8-10 September 2014.
28. Jeffery GB. *The Motion of Ellipsoidal Particles Immersed in a Viscous Fluid*. Proceeding of the RSL 1922; 102(715): 161-179.
29. Tran-Son Tay R, Sutera SP, Zahalak GI, Rao PR. *Membrane Stress and Internal Pressure in a Red Blood Cell Freely Suspended in a Shear Flow*. Biophysical J 1987; 51: 915-924.
30. Keller SR, Skalak R. *Motion of a Tank-treading Ellipsoidal Particle in a Shear Flow*. J of Fluid Mechanics 1982; 120: 27-47.
31. Skotheim JM, Secomb TW. *Red Blood Cells and Other Nonspherical Capsules in Shear Flow: Oscillatory Dynamics and the Tank-treading-to-tumbling Transition*. Physical Review Letters 2007; 98(078301): 1-4.
32. Tran-Son Tay R, Sutera SP, Rao PR. *Determination of Red Blood Cell Membrane Viscosity from Rheoscopic Observation of Tank-treading Motion*. Biophysical J 1984; 46: 65-72.
33. Kuypers F. *Red Cell Membrane Damage*. J Heart Valve Dis 1998; 7: 387-395.
34. Rand RP. *Mechanical Properties of the Red Cell Membrane. II. Viscoelastic Breakdown of the Membrane*. Biophysical J 1964; 4: 303-316.
35. Blackshear PL. *Mechanical Hemolysis in Flowing Blood*. "Biomechanics: Its Foundation and Objectives", Fung YC, Prentice Hall 1972, pp 501-528.
36. Bronkhorst PJH, Streekstra GJ, Grimbergen J, Nijhof EJ, Sixma JJ, Brakenhoff GJ. *A New Method to Study Shape Recovery of Red Blood Cells Using Multiple Optical Trapping*. Biophysical J 1995; 69: 1666-1673.
37. Dasi LP, Ge L, Simon HA, Sotiropoulos F, Yoganathan AP. *Vorticity Dynamics of a BMHV in an Axisymmetric Aorta*. Physics of Fluid 2007; 19(067105): 1-17.

38. Shahriari S, Maleki H, Hassan I, Kadem L. *Evaluation of Shear Stress Accumulation on Blood Components in Normal and Dysfunctional Bileaflet Mechanical Heart Valves Using Smoothed Particle Hydrodynamics*. J of Biomech 2012; 45: 2637-2644.
39. Fung YCB, Tong P. *Theory of the Sphering of Red Blood Cells*. Biophysical J 1968; 8: 175-198.
40. Shioi K, Nagata Y, Mase T, Aoyama T, Katoh S, Tsuchioka H. *Evaluation of Intravascular Hemolysis by Haptoglobin Administration after Prosthetic Valve Replacement*. Jpn Circulation J 1993; 57: 322-327.
41. Warnes C, Honey M, Brooks N, Davies J, Gorman A, Parker N. *Mechanical Haemolytic Anaemia After Valve Repair Operations for Non-rheumatic Mitral Regurgitation*. Br Heart J 1980; 44: 381-385.
42. Nagel RL, Gibson QH. *Kinetics and Mechanism of Complex Formation between Hemoglobin and Haptoglobin*. The J of Biological Chemistry 1967; 242(15): 3428-3434.
43. Nagel RL, Gibson QH. *The Binding of Hemoglobin to Haptoglobin and Its Relation to Subunit Dissociation of Hemoglobin*. The J of Biological Chemistry 1970; 246(1): 69-73.
44. Fogelson AL, Guy RD. *Platelet-wall Interactions in Continuum Models of Platelet Thrombosis: Formulation and Numerical Solution*. Mathematical Medicine and Biology 2004; 21: 293-334.

R

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato possibile grazie alla grandissima disponibilità ed all'altissima professionalità e preparazione del laboratorio di Biofluidodinamica Cardiovascolare del Dipartimento di Ingegneria Civile Edile ed Ambientale (DICEA) dell'Università degli Studi di Padova. In particolare mi preme di ringraziare la Prof.ssa Francesca Maria Susin, dotata di uno spirito unico al mondo: ha deciso di capirmi e venirmi incontro in un momento difficile dimostrando grande umanità e spirito di comprensione. Ringrazio l'Ing. Riccardo Toninato, prima compagno e poi correlatore, e il Prof. Giuseppe Fadda; in particolare Riccardo per la sua pazienza nello starmi dietro in ogni aspetto del lavoro e nei confronti del quale sarò sempre grato.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori Maria Antonietta e Dario per il loro appoggio incondizionato e sempre presente, senza il quale non sarei mai arrivato dove mi trovo oggi.

*When I heard the learn'd astronomer
When the proof, the figures, were ranged in columns before me
When I was shown the charts and the diagrams, to add, divide, and measure them
When I, sitting, heard the astronomer, where he lectured with much applause in the lecture room
How soon, unaccountable, I became tired and sick
Till rising and gliding out, I wander'd off by myself
In the mystical moist night air, and from time to time,
Look'd up in perfect silence at the stars.*

"When I heard the Learn'd Astronomer"

Walt Whitman