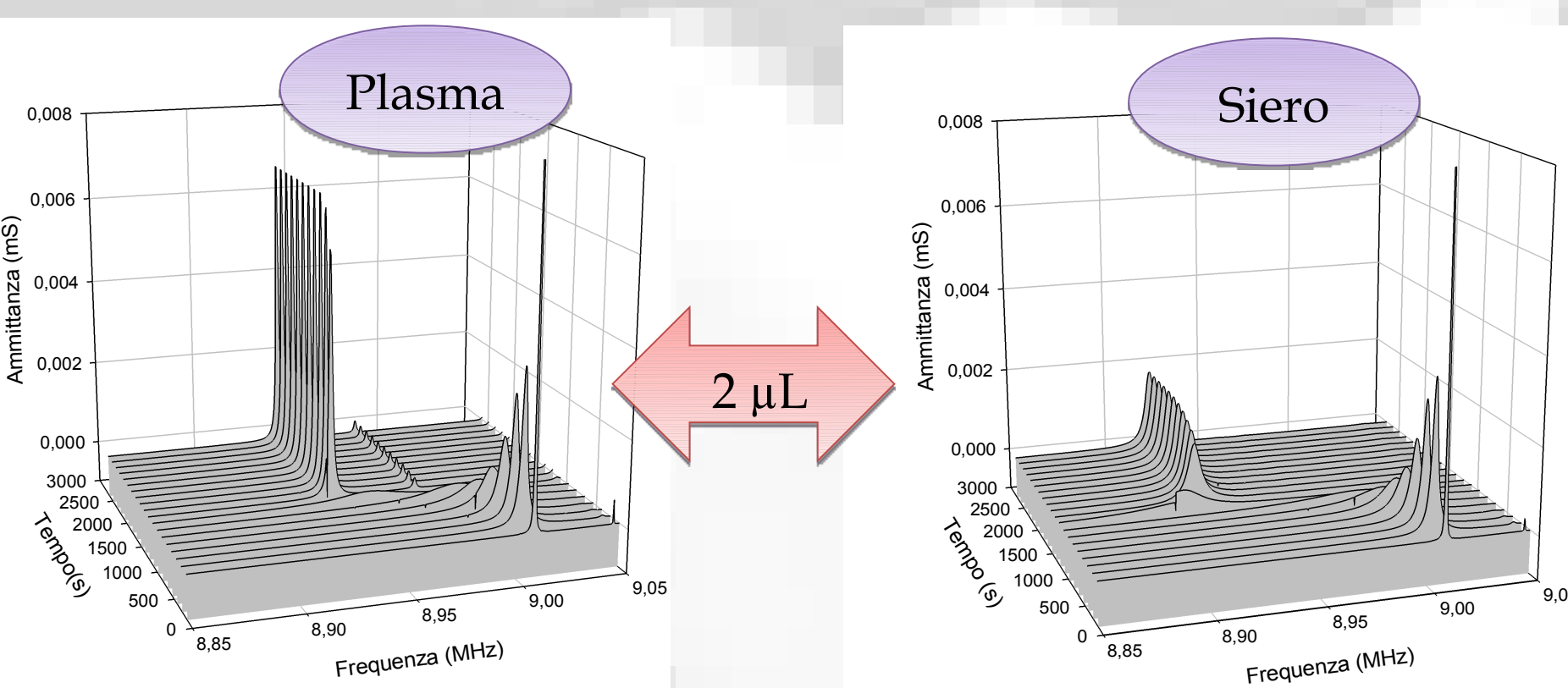


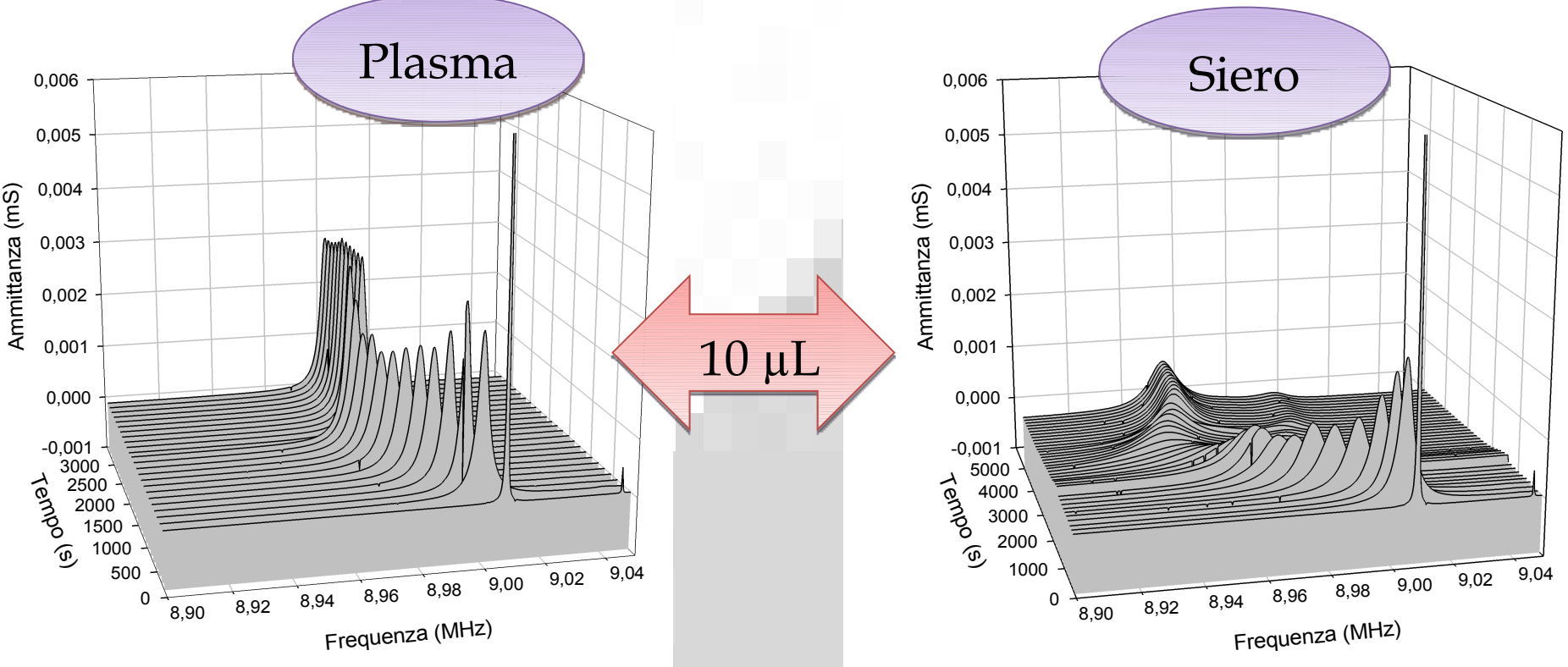
INTRODUZIONE

Lo studio ed il controllo dei processi di fibrinolisi e coagulazione del sangue rivestono un vasto interesse medico e clinico in particolar modo per quei pazienti con patologie cardiovascolari, portatori di protesi cardiache ed in tutti quei trattamenti nei quali il sangue entra a contatto con superfici artificiali. L'impiego di anticoagulanti, tipicamente utilizzati in questi casi per prevenire o minimizzare gli indesiderati ma inevitabili effetti di clotting, richiede il frequente controllo di alcuni parametri ematici (ad esempio tempo di coagulazione) pena l'instaurarsi di una serie di patologie che possono gravemente compromettere la salute del paziente. Il tempo di coagulazione del sangue viene tipicamente valutato dalla misura della variazione della sua viscosità su processi di coagulazione indotti mediante attivatori interfasali o enzimi. Quantunque esistano ben note procedure cliniche strumentali *ad hoc*, recentemente si sta affacciando l'approccio alternativo basato sui biosensori [1-3], nell'intento di produrre dispositivi avanzati in grado di fornire con tempestività e precisione parametri ematoclinici anche in regime di self-analysis.

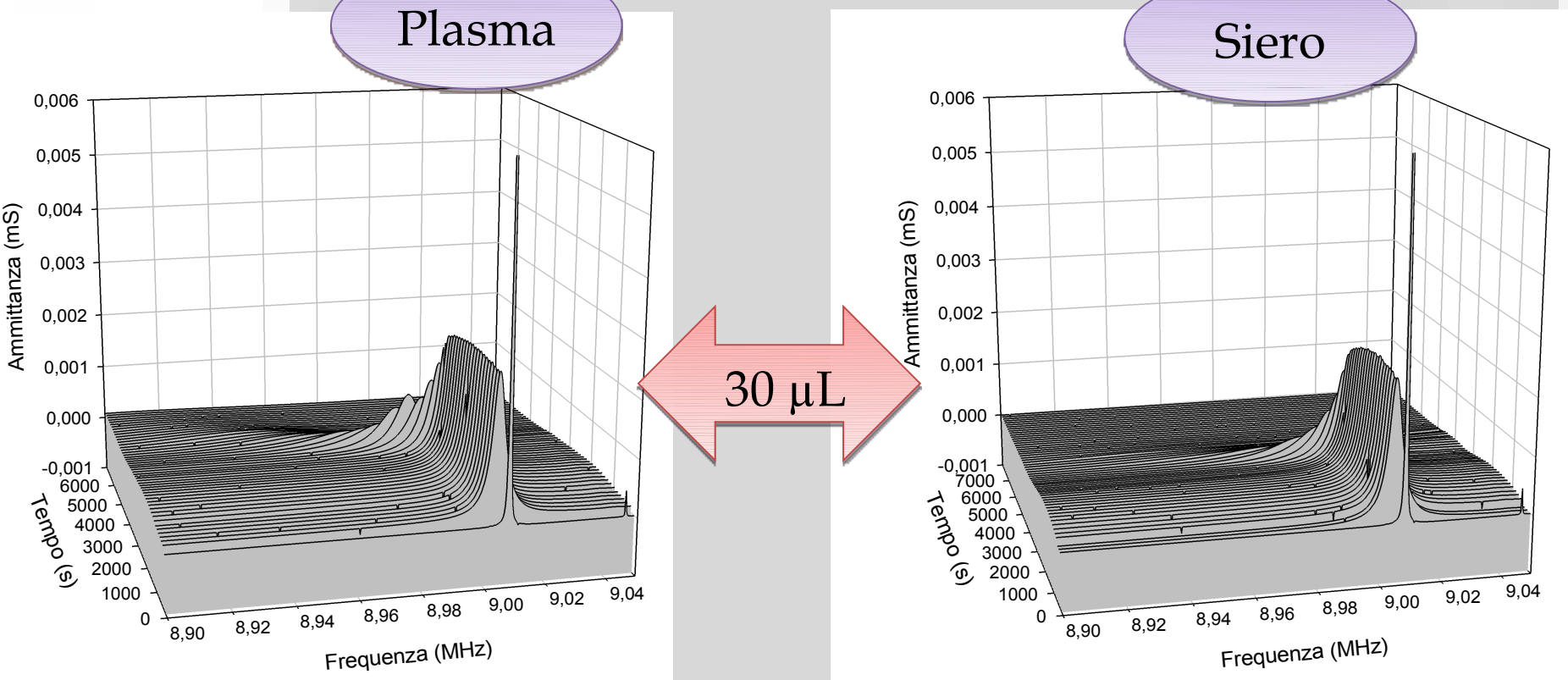
COAGULAZIONE DA SUPERFICIE



Nei grafici relativi a plasma e siero diluiti 1:5 con tampone imidazolo, si osserva una diminuzione di frequenza e ammittanza dovuti alla natura viscoelastica iniziale del deposito. Nel caso del plasma questa diminuzione progressiva, attribuibile alla coagulazione in atto, viene meno improvvisamente e si assiste ad un aumento del picco di ammittanza e del fattore Q, indice della transizione del deposito da viscoelastico a rigido. Viceversa il siero, non coagulando, manifesta un debole rialzamento del picco accompagnato da un'ampiezza di banda ancora notevole. Queste differenze dimostrano il diverso comportamento che plasma e siero assumono proprio a causa della capacità del solo plasma di coagulare.



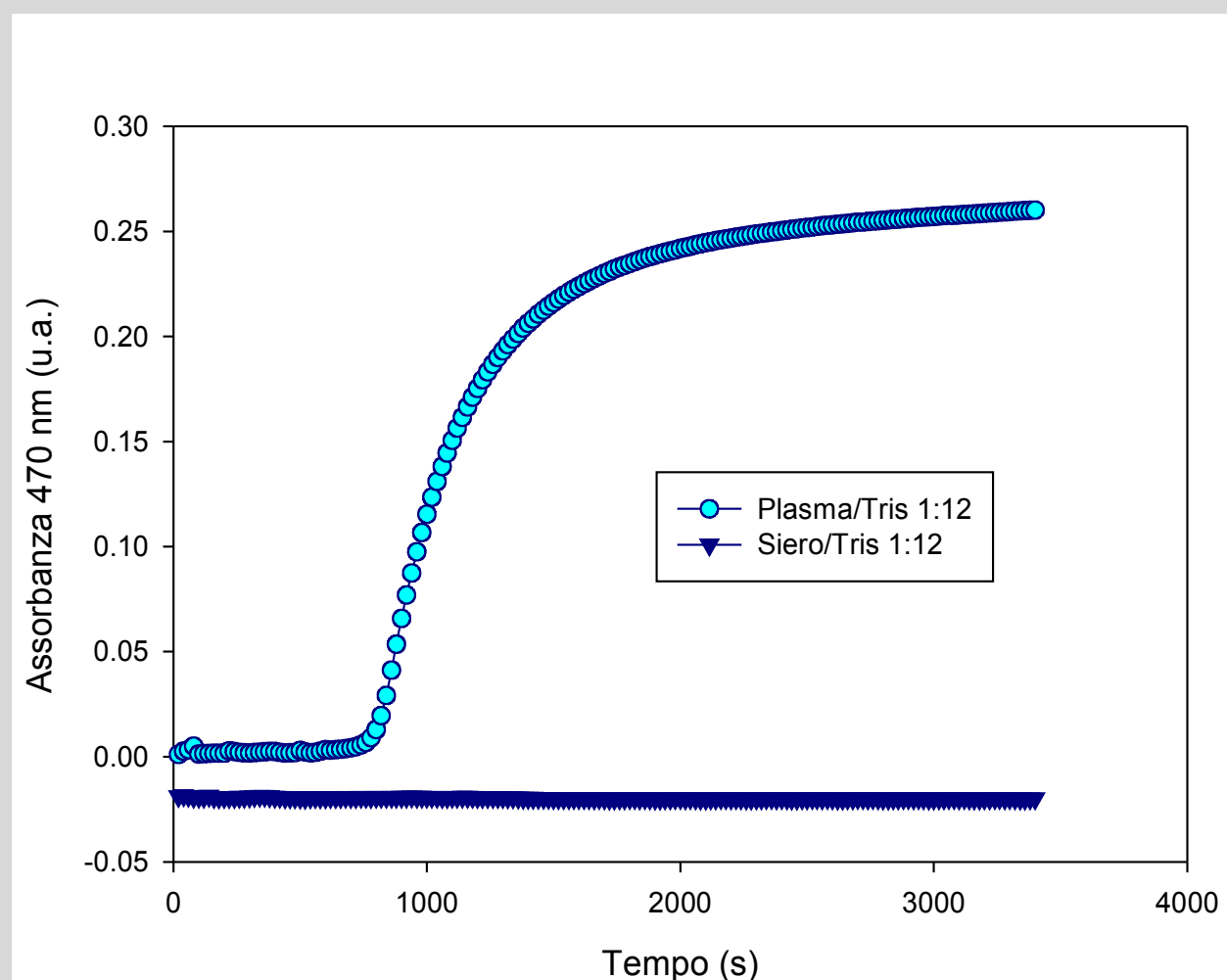
Con volumi maggiori, il fenomeno della coagulazione da superficie si fa sempre meno evidente. Questo è dimostrato infatti nel caso del plasma dalla presenza di picchi terminali che si discostano dal tipico comportamento assunto dal sensore in presenza di un deposito rigido.



Nel caso di volumi ancora più elevati la totale assenza della coagulazione da superficie è evidenziata dalle forti analogie tra plasma e siero.

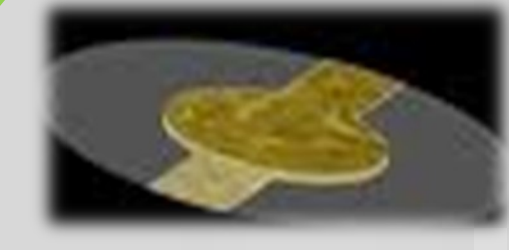
COAGULAZIONE DA TROMBINA MISURE TURBIDIMETRICHE

Per confermare la capacità del sensore di monitorare i tempi di coagulazione, sono stati realizzati esperimenti turbidimetrici alle stesse condizioni sperimentali.

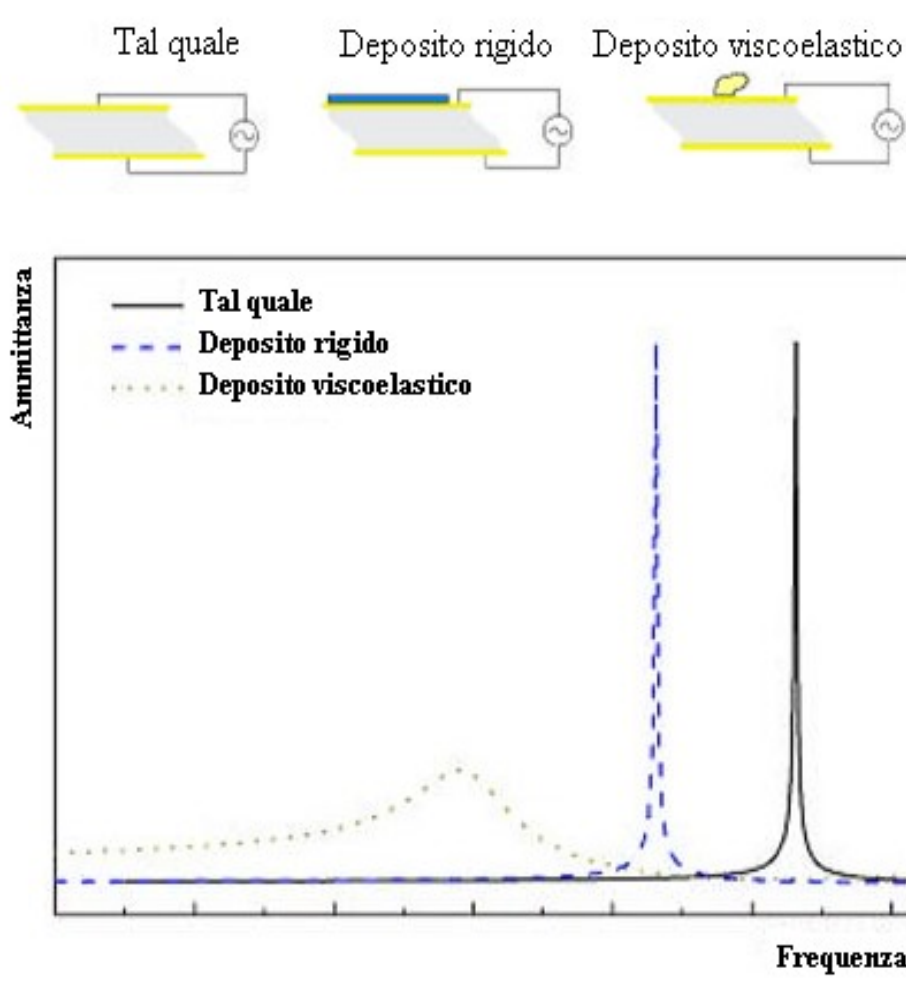


Campioni di plasma e siero, diluiti 1:12 con tampone TRIS, sono stati trattati con eccesso di Trombina calcica e analizzati per via spettrofotometrica a 37°C. Mentre per il siero non si osserva alcuna variazione di assorbanza, nel plasma si verifica un aumento notevole, attribuibile al processo di formazione del coagulo. Da ciò si evince come l'evoluzione temporale della curva possa fornire informazioni sul tempo di coagulazione.

QCM



Il presente lavoro di ricerca è rivolto allo sviluppo ed utilizzo di un originale sensore basato su Microbilancia a Cristallo di Quarzo, in grado di seguire le cinetiche di emocoagulazione mediante la deposizione del campione sulla superficie del cristallo e la contestuale acquisizione dei relativi spettri di ammittanza.



E' possibile discriminare la natura del deposito analizzando i relativi picchi di ammittanza. Poiché il quarzo presenta un proprio picco caratteristico, con la deposizione di un film rigido si osservano spostamenti a frequenze più basse senza variazioni in ampiezza, altezza e fattore Q. Un film viscoelastico invece, genera una diminuzione netta sia di frequenza che di ammittanza con un aumento notevole dell'ampiezza del picco e diminuzione del fattore Q [4].

Il sistema messo a punto è in grado di seguire il processo di coagulazione dei campioni di plasma del volume di pochi µL sia indotto da superficie sia tramite Trombina.

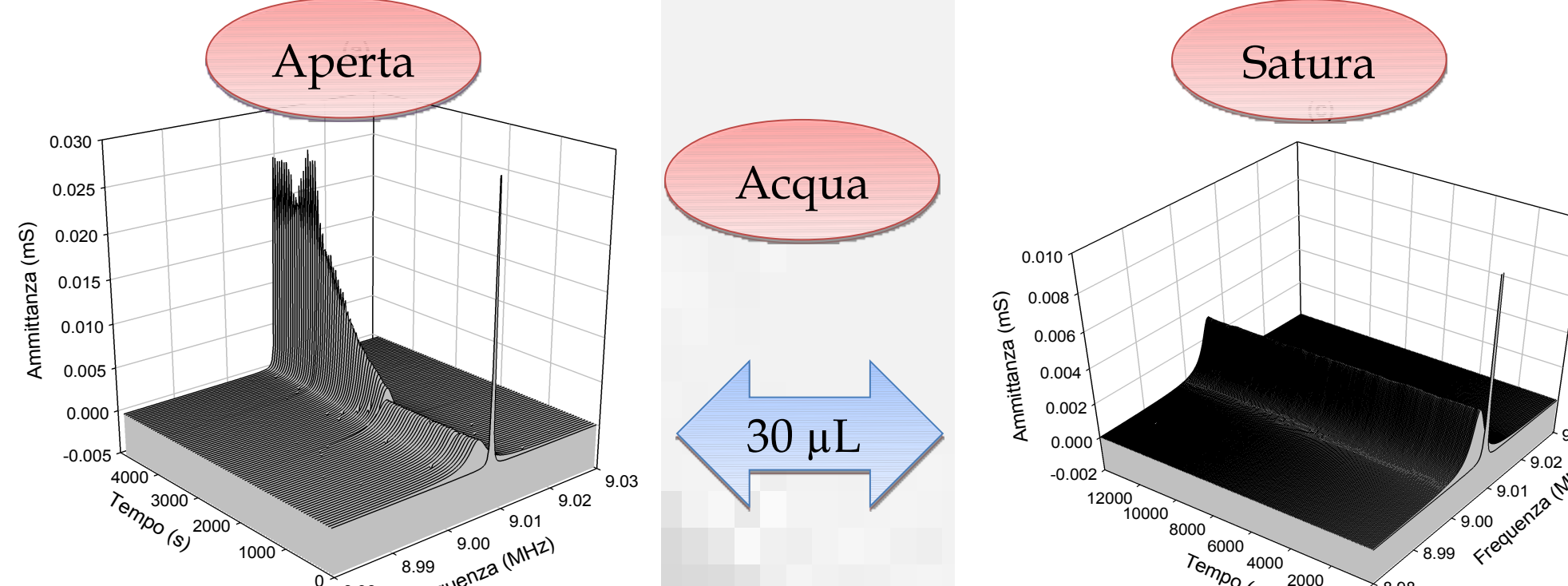
OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI DI ANALISI



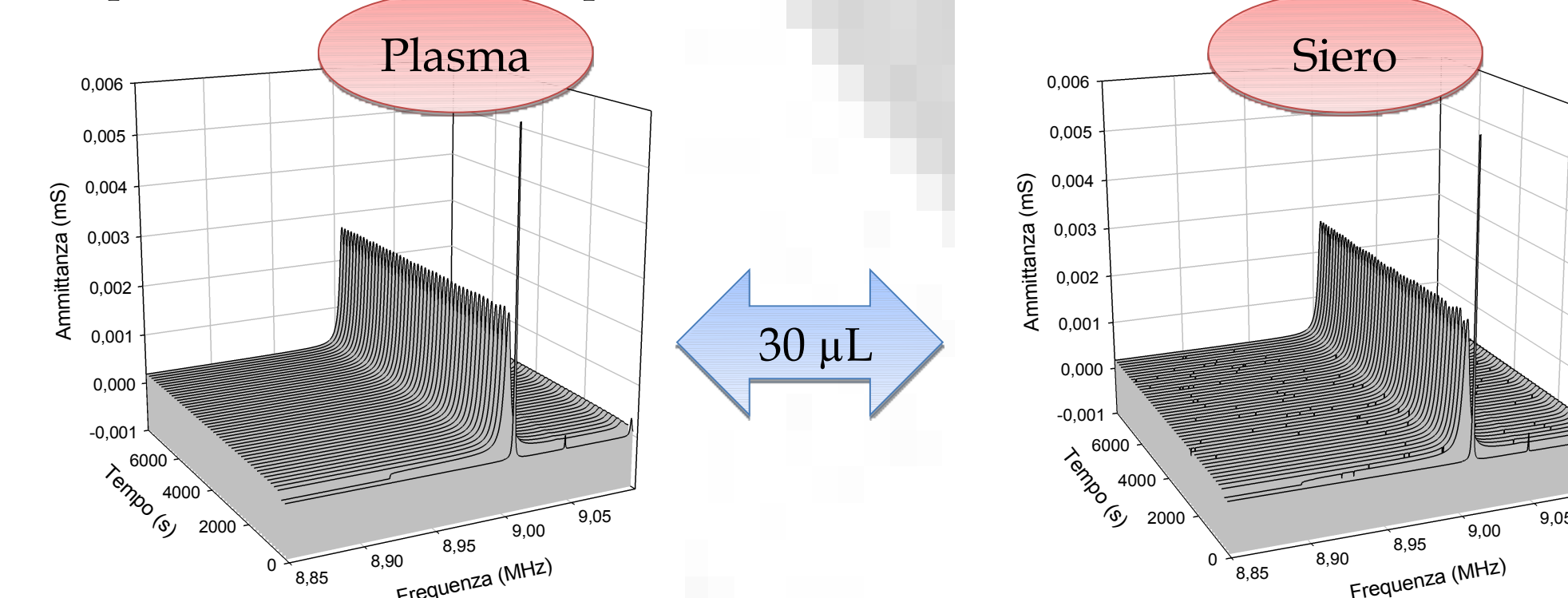
Cella QCM lasciata aperta alla comune atmosfera del laboratorio

Cella QCM chiusa e satura dei vapori del solvente in esame

Per controllare eventuali fenomeni di evaporazione che avrebbero potuto mascherare la cinetica di coagulazione, sono stati studiati i processi di evaporazione di campioni semplici quali l'acqua per ottenere le condizioni ottimali per l'analisi di campioni di plasma.

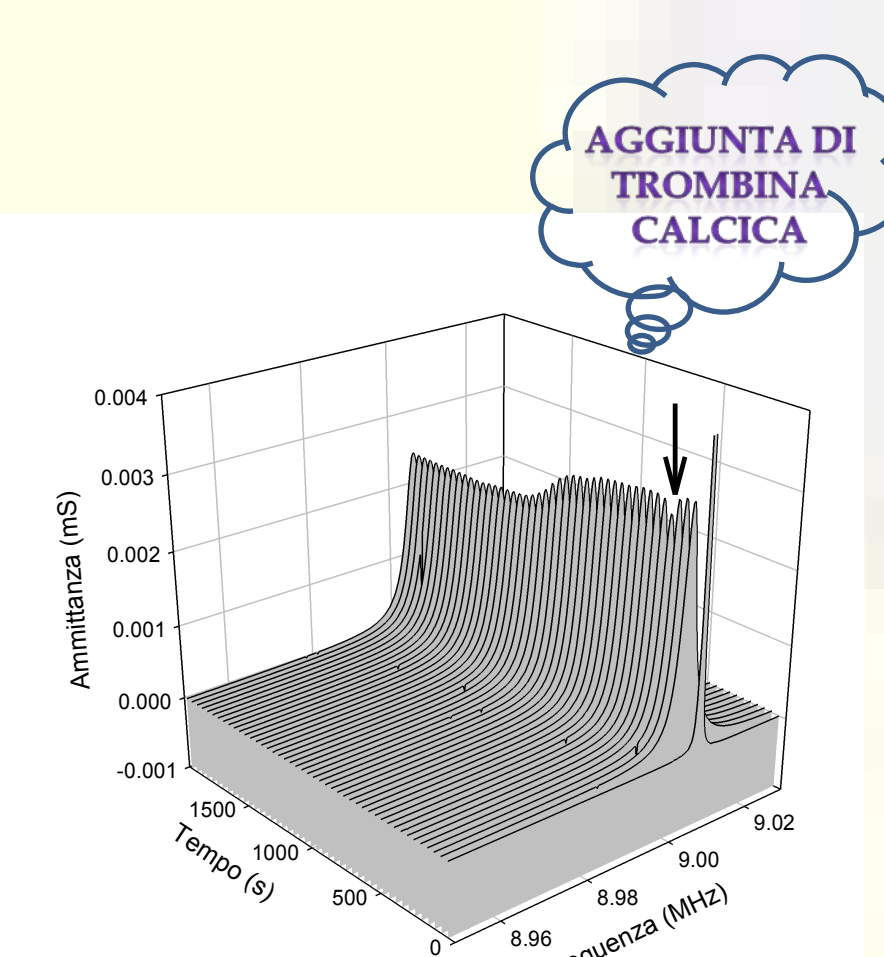


Si è osservato il comportamento del sensore a seguito della deposizione e successiva evaporazione di acqua a cella aperta e saturata di vapor acqueo. E' evidente come la condizione di saturazione possa rallentare così tanto l'evaporazione da non essere significativamente osservata per tutta la durata dell'esperimento.



Con l'utilizzo della cella chiusa è stato così possibile minimizzare gli effetti parassiti di evaporazione come dimostrano tali grafici. Siero e plasma presentano lo stesso comportamento poiché il volume elevato e la condizione di saturazione impediscono non solo la coagulazione del plasma ma anche l'evaporazione di entrambi.

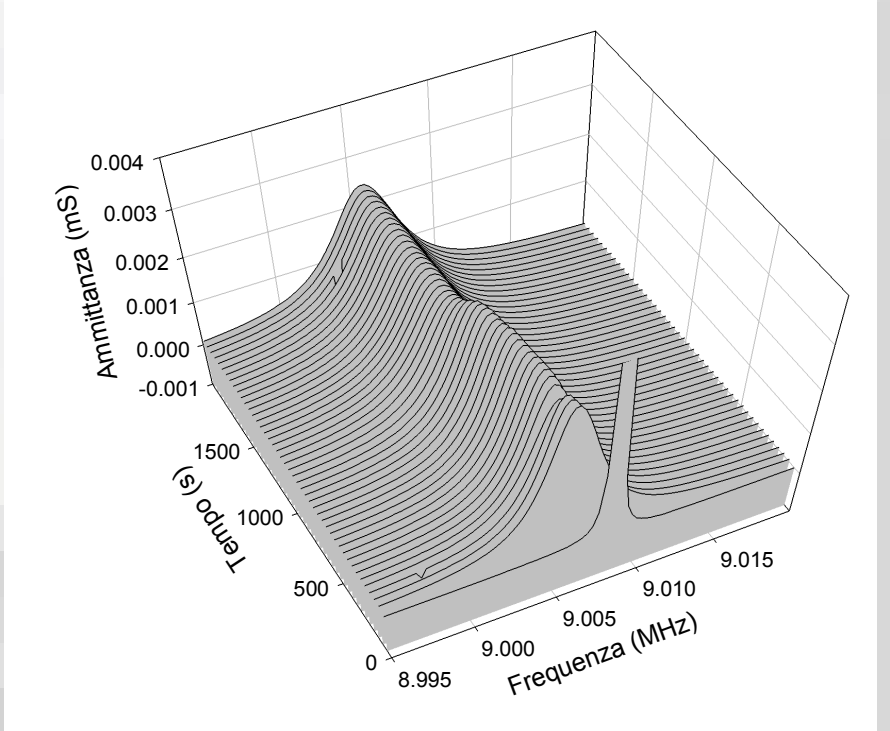
COAGULAZIONE DA TROMBINA MISURE QCM



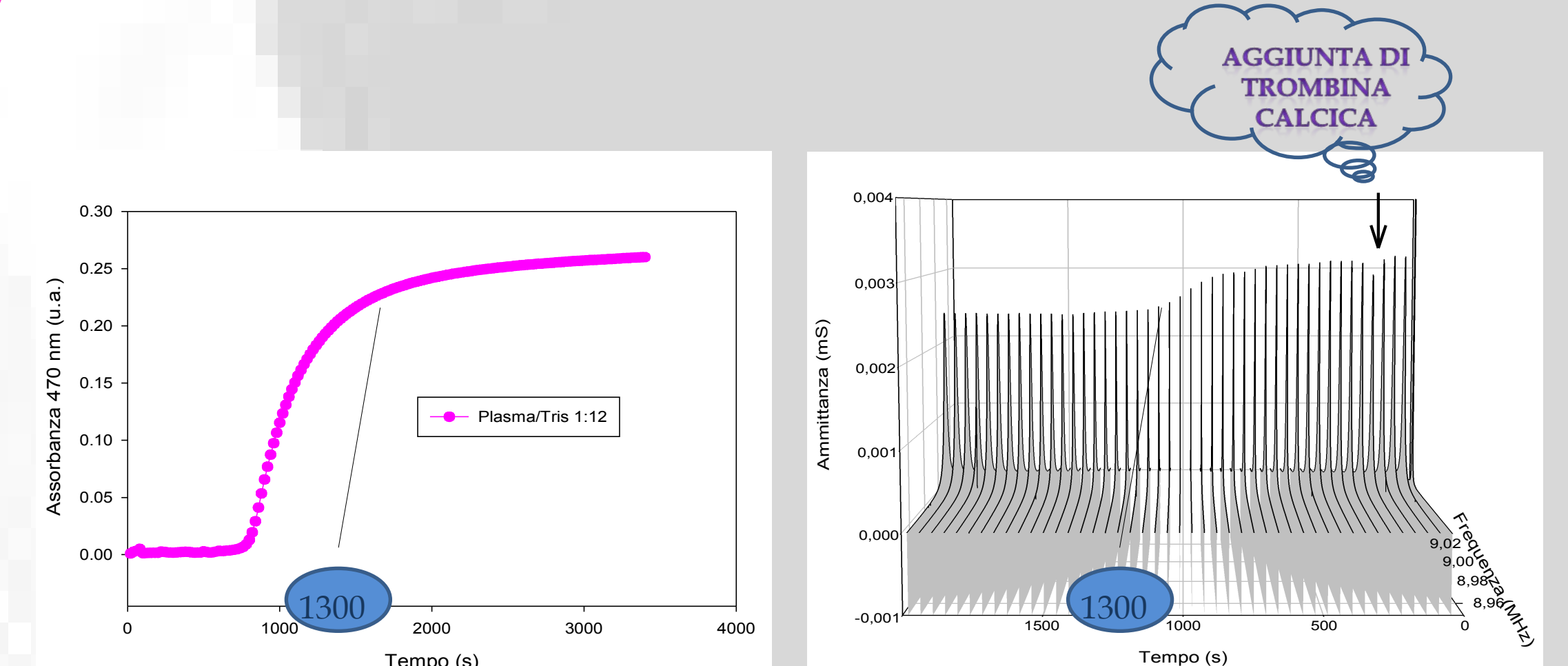
Aggiungendo *in situ* un eccesso di trombina a un campione di plasma diluito con tampone TRIS 1:12 depositato sulla superficie del cristallo, si osserva un andamento sigmoidale dei picchi di ammittanza indicativo della coagulazione in atto, seguito da una fase di plateau che indica l'avvenuta coagulazione.

In quest'ultima fase, i picchi di ammittanza non rispecchiano le caratteristiche tipiche di un deposito rigido poiché il coagulo assume un aspetto gelatinoso.

Parallelamente è possibile osservare una diminuzione poco accentuata della frequenza di risonanza come evidenziato nel grafico sottostante.



METODICHE A CONFRONTO



Dal confronto dei risultati ottenuti mediante le due tecniche sperimentali, si osserva una significativa concordanza nei tempi di coagulazione che risulta essere intorno ai 1300 secondi nel caso qui riportato di plasma diluito 1:12 con TRIS.

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro, l'analisi effettuata su campioni di plasma in opportune condizioni sperimentali ha evidenziato la possibilità di seguire il processo di coagulazione del sangue mediante l'analisi degli spettri di ammittanza. Questo permette di acquisire informazioni riguardanti la formazione del vero e proprio coagulo solido e il carattere di rigidità dello stesso anche se, per volumi maggiori, si evidenzia una riduzione del fenomeno di coagulazione indotto da superficie. Dunque il mezzo di acquisizione sperimentale sviluppato nel presente lavoro di ricerca può essere considerato un ottimo approccio per l'acquisizione di parametri di interesse clinico, la cui importanza e originalità è avvalorata dal fatto che risulta essere a tutt'oggi scarsamente esplorato in letteratura scientifica.

Bibliografia

- [1] Hansson, K. M. Vikinge, T. P. Ronby, M. Tengvall, P. Lundstrom, L. Johansen, K. Lindahl, T. L., *Biosens. Bioelectron.*, 14, 671 (1999).
- [2] Puckett, L. G. Barrett, G. Kouzoudis, D. Grimes, C. Bachas, L. G., *Biosens. Bioelectron.*, 18, 675 (2003).
- [3] Andersson, M. Andersson, J. Sellborn, A. Berglin, M. Nilsson, B. Elwing, H., *Biosens. Bioelectron.*, 21, 79 (2005).
- [4] T. Nakamoto and T. Kobayashi; Development of circuit for measuring both Q variation and resonant frequency shift of quartz crystal microbalance, *Transaction on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 41 p. 806-811 (1994).