

Un nuovo sguardo sullo *shear-thinning* del sangue

L. Lanotte^{*1}, J. Mauer², S. Mendez³, D.A. Fedosov², J.-M. Fromental⁴, V. Clavería¹, F. Nicoud³, G. Gompper², M. Abkarian¹

¹ Centre de Biochimie Structurale, CNRS UMR 5048, INSERM UMR 1054, University of Montpellier, 34090 Montpellier, France

² Institute of Complex Systems and Institute for Advanced Simulation, Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany

³ Institut Montpellierain Alexander Grothendieck, UMR 5149 051, University of Montpellier, 34095 Montpellier, France

⁴ Laboratoire Charles Coulomb, CNRS UMR 5587, University of Montpellier, 34095 Montpellier, France

Ricevuto: 15 dicembre 2016 / Accettato: 2 gennaio 2017 / Pubblicato online: 31 gennaio 2017

Sommario Il sangue è un fluido a carattere reofluidificante. Per *shear rate* $<1 \text{ s}^{-1}$, la sua diminuzione di viscosità è stata interpretata principalmente alla luce della rottura dei cosiddetti "rouleaux", composti da pile di globuli rossi (GR) di dimensione variabile. Per intensità di *shear* superiori, nell'intervallo tra 10 e 1500 s^{-1} , dove i GR si muovono come elementi singoli, gli studi presenti in letteratura sono stati effettuati su globuli rossi sospesi in fluidi viscosi atti a simulare la viscosità del sangue in condizioni fisiologiche. In tali condizioni sperimentali, è stato osservato come i GR si deformino assumendo una forma ellissoidale allineata stabilmente nella direzione del flusso, mentre la loro membrana ruota attorno al centro di massa (*tank-treading*). Questo comportamento, simile a quello osservato nelle gocce, sembrava fornire una spiegazione plausibile allo *shear-thinning* del sangue. In questo lavoro, tramite un approccio reologico e microfluidico corroborato da simulazioni numeriche, mostriamo che la dinamica del globulo rosso in fluidi dalle caratteristiche simili al plasma è caratterizzata da una sequenza di deformazione ben differente per valori crescenti di *shear rate*, passando, nell'ordine, da discociti a stomatociti, trilobe e hexalobe. In nessun caso sono stati osservati degli ellissoidi. Risultati

paragonabili sono stati ottenuti anche ad ematocriti fisiologici. Soprattutto, il nostro studio propone un collegamento tra la distribuzione statistica delle forme dei GR e i differenti regimi di flusso tipici della reologia sanguigna ad elevati *shear rate*, arrivando a fornire un'innovativa reinterpretazione del comportamento reofluidificante del sangue.

Parole chiave reologia, globuli rossi, dinamica dei globuli rossi, simulazione del sangue

Abstract *Blood is a shear-thinning fluid. At shear rates $<1 \text{ s}^{-1}$, its drop of viscosity has been related primarily to the breaking-up of networks of "rouleaux" formed by stacked red blood cells (RBCs). For higher shear strength in the range 10-1500 s^{-1} , where RBCs flow as single elements, studies demonstrated that RBCs suspended in a viscous fluid mimicking the viscosity of whole blood, deformed into ellipsoids aligned steadily in the direction of the flow, while their membrane rotated about their center of mass like a tank-tread. Such drop-like behavior seemed to explain shear-thinning. Here, using rheometers, microfluidics and simulations, we show that the dynamics of single RBCs in plasma-like fluids display a different sequence of deformation for increasing shear rates going from discocytes to successively, stomatocytes, folded stomatocytes, trilobes and hexalobes, but never ellipsoids. This result is also identical for physiological hematocrits.*

We correlate this shape diagram to the different regimes in blood rheology for high shear rates and propose a new-look at the interpretation of blood shear-thinning behavior.

Keywords *rheology, red blood cell, RBC dynamics, blood simulation*

1. Introduzione

Il sangue rappresenta un affascinante esempio di sospensione concentrata di oggetti deformabili, rappresentati in maniera preponderante dai globuli rossi (GR). Questi, infatti, risultano essere fino a mille volte più concentrati di piastrine e globuli bianchi e la loro frazione volumica nel plasma, definita ematocrito (Ht), è pari a circa 45% in condizioni fisiologiche. Il comportamento dinamico locale, nonché l'interazione tra i GR, influenza fortemente la reologia del sangue e regola il corretto irroramento del fitto network di vasi che costituisce il sistema circolatorio. Lo studio delle proprietà reologiche del sangue trae origine da alcuni lavori pionieristici realizzati nel corso degli anni '60 (Wells and Merrill 1961, Chien 1970) in cui, per la prima volta, venne osservato il carattere reo-fluidificante del sangue quando sottoposto ad un flusso di *shear*. Questo comportamento, denominato *shear-thinning*, è governato dall'aggregabilità e dalla deformabilità dei globuli rossi poiché il plasma, ovvero il fluido sospendente in questo caso, mostra essenzialmente un carattere Newtoniano (viscosità di *shear* costante attorno agli 1.2 cP a 37°C). Per flussi di intensità crescente fino a 10 s⁻¹, si registra una drastica diminuzione della viscosità da 100 a 10 cP. Tale repentina variazione è dovuta alla graduale frammentazione degli aggregati di GR, la cui formazione è incentivata dalla presenza di fibrinogeno nel plasma. Per valori di *shear rate* compresi tra 10 e 1500 s⁻¹, tipici della microcircolazione, si riscontra un'ulteriore diminuzione della viscosità fino a 2-3 cP, attribuibile al simultaneo effetto della deformabilità e della dinamica in flusso dei GR (Chien 1970). I valori riportati possono subire variazioni notevoli in funzione dell'ematocrito dei campioni analizzati e della viscosità interna dei globuli (circa 5 cP a 37°C), la quale è strettamente legata alla predominante presenza dell'emoglobina nel citoplasma (Wells and Schmid-Schönbein 1969).

Il nesso tra deformabilità cellulare e *shear-thinning* risulta tuttora non del tutto chiarito, nonostante tale legame risulti indispensabile alla comprensione delle dinamiche del flusso sanguigno in condizioni sia fisiologiche, che patologiche (diabetes mellitus, emoglobinopatie come l'anemia falciforme, disfunzioni vascolari, Diez-Silva et al.

2010). L'attuale paradigma che lega la dinamica del GR alla reo-fluidificazione del sangue ha origine da alcuni lavori sperimentali degli anni '70-'80 realizzati in microcanali e reoscopi (apparatati che consentono, contemporaneamente, la misura dei principali parametri reologici di un campione e l'osservazione della sua struttura a livello microscopico). Tali lavori hanno evidenziato un'analogia tra il comportamento del sangue e quello delle emulsioni classiche (Goldsmith and Marlow 1972, Fisher et al. 1978), mostrando come, a *shear stress* crescenti, i globuli tendano ad allinearsi stabilmente nella direzione del flusso, assumendo una forma ellissoidale caratterizzata da una circolazione continua della membrana. Questo particolare regime di flusso, osservabile di frequente anche nelle gocce, è stato denominato *tank-treading* (Fisher et al. 1978, Abkarian et al. 2007). La forma ellissoidale assunta dai GR e la contemporanea rotazione della membrana sembrano favorire la minimizzazione dei disturbi delle linee di flusso e, di conseguenza, diminuire la viscosità della sospensione. Tuttavia, tali osservazioni sperimentali sono state tutte effettuate in condizioni diluite, dove le cellule sono disperse in fluidi la cui viscosità è maggiore rispetto a quella del citoplasma (ad esempio, ad alta concentrazione di polisaccaridi come il destrano). Con la scelta di mezzi sospendenti così viscosi, i ricercatori supponevano di riprodurre le condizioni fisiologiche (Ht e *shear rate* elevati), nelle quali ciascun GR è circondato da numerose altre cellule con cui interagisce (Fisher and Schmid-Schönbein 1977).

In sintesi, il modello di riferimento per l'interpretazione dello *shear-thinning* del sangue fonda le sue radici su una sperimentazione effettuata in condizioni non esattamente realistiche, i cui risultati sono stati tuttavia ritenuti attendibili anche in condizioni di flusso sanguigno fisiologiche. Se l'impatto dell'intensità del flusso sulla forma e la dinamica dei globuli è stato esplorato approfonditamente, il ruolo del contrasto di viscosità λ , ovvero il rapporto tra la viscosità del citoplasma cellulare e quella del fluido sospendente, è stato trascurato (Dupire et al. 2012).

A tal proposito, un nostro recente lavoro (Lanotte et al. 2016), la cui parte sperimentale è stata svolta al Centre de Biochimie Structurale di Montpellier (Francia), è stato incentrato sullo studio della forma e del regime dinamico dei GR per λ fisiologico (~ 5) in un intervallo di *shear rate* crescenti da 10 e 1500 s⁻¹. Le osservazioni sono state effettuate in chip microfluidici in condizioni non confinate, su sospensioni dall'ematocrito compreso tra 5 e 45%. I nostri risultati rivelano, per flussi molto intensi, delle dinamiche

assolutamente variegata e sorprendenti, caratterizzate dalla rotazione di forme ribattezzate "polilobate" e dalla assoluta mancanza di *tank-treading* della membrana cellulare. Inoltre, l'esame morfologico dei GR in funzione dello *shear rate* è stato associato a misure di reometria per fornire una convincente ed innovativa reinterpretazione delle proprietà di reo-fluidificazione del sangue. I risultati sperimentali sono stati ulteriormente corroborati da simulazioni numeriche svolte presso i gruppi dell'Institut Montpellierain Alexander Grothendieck (Montpellier, Francia) e dell'Institute of Complex Systems and Institute for Advanced Simulation (Jülich, Germania), attraverso due diverse tecniche in 3D: un approccio continuo basato sul metodo "finite-volume" ed un altro mesoscopico incentrato sul metodo "smoothed dissipative particle dynamics (SDPD)". Date le condizioni sperimentali di flusso nelle quali lo studio è stato svolto, paragonabili a quelle a cui i GR sono sottoposti nella microcircolazione (arteriole e venule, con diametro dei vasi superiore a 40 μm), il nostro lavoro si propone come base per una reinterpretazione dei processi fisiologici riguardanti la circolazione sanguigna, offrendo spunti per eventuali applicazioni diagnostiche correlate alla nostra scoperta.

2. Risultati

2.1 Morfologia e dinamica dei globuli rossi in flusso di *shear*

La prima fase del lavoro è stata focalizzata sullo studio della forma di globuli rossi in flusso di *shear* in condizioni diluite. Le cellule sono state sottoposte a *shear rate* compresi tra 10 s^{-1} e 2,000 s^{-1} attraverso un reometro a geometria cono-piatto. I GR sono stati solidificati in flusso grazie

all'aggiunta di glutaraldeide e recuperati per osservazioni in campo chiaro (BF) e con microscopia confocale dopo essere stati marcati in fluorescenza (fare riferimento alla sezione Materials and Methods di Lanotte et al. (2016) per ulteriori particolari riguardanti gli esperimenti). Le morfologie sono state analizzate e classificate in funzione dello *shear rate* usando una procedura di *image analysis* da noi appositamente sviluppata. L'osservazione al microscopio e la successiva analisi statistica della morfologia delle cellule evidenziano un comportamento dinamico molto più variegato rispetto a quanto predetto dai precedenti lavori in letteratura. In effetti, in presenza di flussi deboli ($< 10 \text{ s}^{-1}$), i GR conservano la tipica forma biconcava (discocita) osservata in condizioni statiche. Al contrario, all'aumentare dell'intensità del flusso, la percentuale di discociti diminuisce in maniera rilevante, fino a quasi diventare nulla per *shear rate* superiori a 1000 s^{-1} . L'incremento dello *shear rate* (tra 10 s^{-1} e 40 s^{-1}) provoca, innanzitutto, la perdita di una delle due concavità dei GR, portando alla formazione di un ingente numero di stomatociti, cellule dalla forma simile ad una coppa. Inoltre, per valori di *shear* crescenti, tali stomatociti subiscono un'elongazione e, conseguentemente, una deformazione della concavità che li contraddistingue, come mostrato nelle immagini nel riquadro blu di Fig.1. Le forme a coppa sono predominanti fino ai 400 s^{-1} , valore oltre il quale si inizia a rilevare la presenza di GR caratterizzati da tre e sei lobi, definiti rispettivamente come trilobe e hexalobe. In particolare, l'analisi statistica condotta tra 400 s^{-1} e 2,000 s^{-1} (Lanotte et al. 2016) sottolinea l'aumento repentino delle cellule trilobate fino a circa 1,000 s^{-1} e, successivamente, l'incremento consistente delle forme a sei lobi (riquadro rosso di Fig.1). In sintesi, una volta superata la soglia dei 400 s^{-1} , la percentuale di

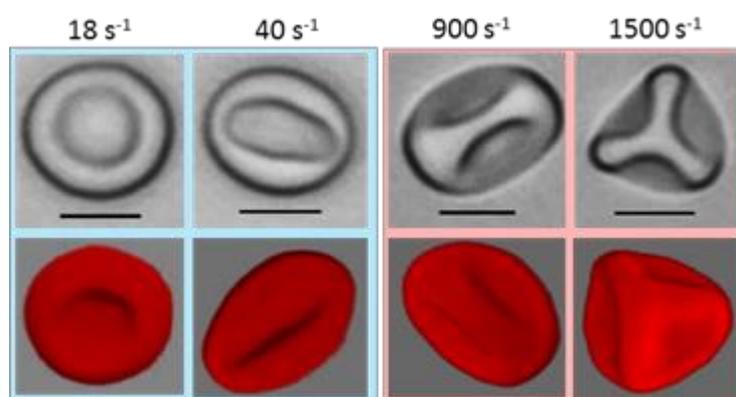


Figura 1 - Morfologia dei globuli rossi a *shear rate* crescenti. La sequenza di immagini in alto è stata acquisita in campo chiaro, quella in basso tramite microscopia confocale utilizzando lo stesso campione. Le immagini evidenziano la formazione di cellule di forma stomatocita fino ai 40 s^{-1} e, successivamente, la transizione verso forme polilobate per flussi di *shear* ingenti (barra dimensionale pari a 5 μm).

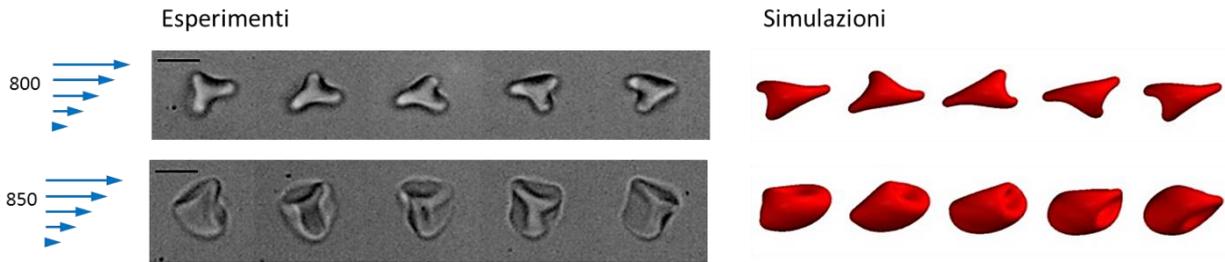


Figura 2 - Osservazione della dinamica di globuli rossi sottoposti a flusso di *shear*. Il regime di flusso rilevato in microcanali ad elevati *shear rate* (rispettivamente 800 s^{-1} ed 850 s^{-1}) è paragonato a quello ottenuto tramite simulazioni numeriche (metodo YALES2BIO) in condizioni di flusso paragonabili.

forme di tipo stomatocita si riduce notevolmente e quelle di tipo polilobato finiscono per rappresentare circa il 70% della popolazione del campione analizzato.

Pur avendo evidenziato il sorprendente effetto che *shear rate* crescenti hanno sulla forma dei globuli rossi, i soli esperimenti di reometria non consentono di comprendere a pieno come queste caratteristiche morfologiche si riflettano sulla dinamica in flusso delle cellule, né di escludere eventuali artefatti dovuti al processo di *hardening* durante gli esperimenti. Ragion per cui, abbiamo svolto degli esperimenti di microfluidica in condizioni non confinate a 25°C su sospensioni di GR in soluzione salina (PBS) arricchita con albumina bovina (BSA, in concentrazione 1 mg/ml) ad ematocrito pari all'1%. Grazie all'utilizzo di una videocamera ad alta velocità di acquisizione, abbiamo studiato il flusso delle cellule nei capillari in funzione dello *shear rate*, il cui valore è stato stimato attraverso la velocità delle cellule e la loro distanza dalle pareti. Ebbene, i risultati degli esperimenti di microfluidica confermano in modo inequivocabile quelli svolti tramite reometria. Anche nei canali è rilevata la transizione da discociti a stomatociti, fino ad arrivare alla formazione dei GR polilobati. I globuli, oltre a una transizione morfologica, hanno evidenziato anche un'interessante variazione in termini di dinamica in flusso, passando dal classico *tumbling* dei discociti in caso di flusso debole, fino ad un regime in cui le cellule sono allungate nella direzione della vorticità (direzione perpendicolare a quella dell'osservatore in Fig.2), mostrando una chiara rotazione dei lobi attorno al loro centro di massa. In Fig.2, è possibile osservare questa dinamica per un trilobe ed un hexalobe per valori di *shear rate* pari rispettivamente a 800 s^{-1} e 850 s^{-1} . L'approccio microfluidico ha consentito di confermare che, in effetti, a valori di *shear rate* crescenti non corrisponde una netta transizione morfologica, quanto piuttosto una variazione nella distribuzione delle forme. Le conclusioni sperimentali sono avvalorate dalle simulazioni numeriche svolte dai

gruppi teorici, le quali, come mostrato nella parte destra di Fig.2, evidenziano un consistente accordo con gli esperimenti sia per quanto riguarda la morfologia che il regime dinamico dei GR in flusso. Per ulteriori dettagli relativi ai risultati sperimentali, rimandiamo alla lettura della sezione RBCs Dynamics in Flow di Lanotte et al. (2016).

La scoperta di nuove forme e dinamiche riguardanti i GR per contrasti di viscosità fisiologici e valori di *shear rate* tipici della microcircolazione, per quanto senza dubbio interessante, non avrebbe un concreto legame con le proprietà del sangue in vivo se lo stesso comportamento non fosse osservato per valori di ematocrito riscontrati realmente nel microcircolo. Esperimenti di reometria e microfluidica, dunque, sono stati condotti anche per frazioni volumiche crescenti di globuli rossi e i risultati hanno messo in evidenza il ruolo fondamentale giocato dalle interazioni dovute agli elevati Ht. Esse provocano la formazione, innanzi tutto, di cellule dalla forma lobata estremamente irregolare, estremamente difficili da classificare (globuli multilobati), e, in secondo luogo, di globuli discoidali la cui superficie risulta caratterizzata da un numero variabile di pieghe, che nel nostro lavoro sono stati denominati *creased discocyte* (Lanotte et al. 2016). Pur considerando, ad ematocriti elevati, la presenza crescente di cellule polilobate e di *creased discocyte* per i valori di Ht=15-30% tipici della microcircolazione, la percentuale di GR polilobati rimane preponderante nei campioni osservati (risultato confermato anche dalle simulazioni numeriche svolte su sospensioni concentrate). Al termine di questa campagna sperimentale, dunque, si può affermare che i globuli polilobati, con il loro caratteristico regime dinamico, sono fondamentali per l'interpretazione delle proprietà macroscopiche del sangue in condizioni di flusso simili.

2.2 Reologia

I promettenti risultati ottenuti osservando il comportamento dinamico dei GR per flussi di *shear*

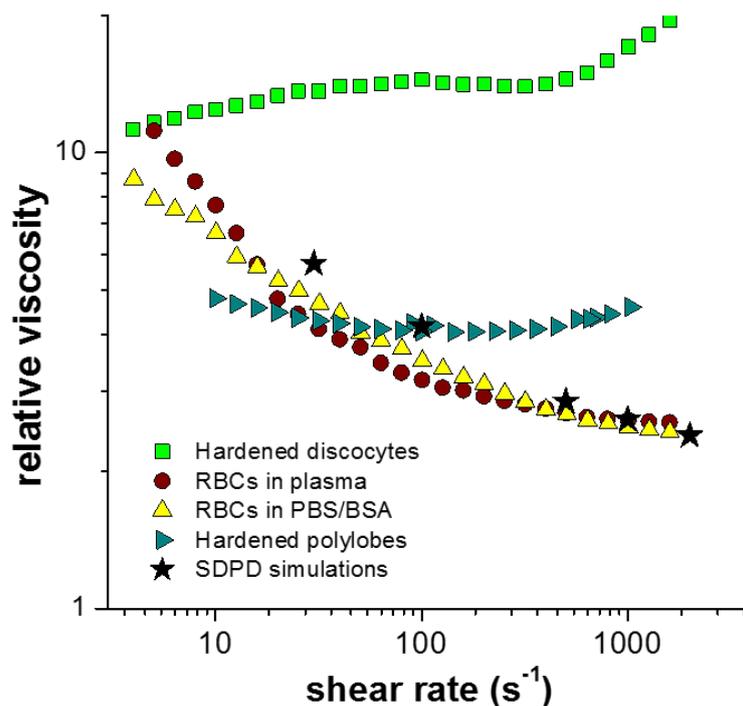


Figura 3 - Andamento della viscosità relativa di sospensioni concentrate ($H_t=45\%$) di GR deformabili in plasma (rosso) e PBS/BSA (giallo) in funzione dello *shear rate*. I valori misurati sono paragonati a quelli ottenuti su sospensioni in PBS/BSA di cellule solidificate in condizioni statiche (verde) e a $1,500\text{ s}^{-1}$ (blu). I punti stellati rappresentano i risultati di simulazioni numeriche svolte con metodo SDPD in condizioni simili a quelle sperimentali.

intensi, non solo consentono di sottolineare il ruolo cruciale del contrasto di viscosità, ma anche di guardare con nuovo interesse alle proprietà reologiche del sangue, le quali sembravano essere state esaurientemente descritte fino a questo momento. Lo scopo principale del nostro lavoro è di riesaminare i diagrammi classici di reologia pubblicati alcuni decenni orsono (Chien 1970) e mettere in discussione l'attuale paradigma che lega la deformazione dei GR e il simultaneo *tank-treading* alla reo-fluidificazione del sangue. Gli esperimenti sono stati condotti a 37°C su sospensioni concentrate di GR ($H_t=45\%$) dispersi in soluzioni di PBS/BSA o nel loro plasma nativo, utilizzando un reometro a geometria Couette e cono-piatto. Le misure di viscosità sono state effettuate in un range di *shear rate* compresi tra 5 s^{-1} e $2,000\text{ s}^{-1}$. In Fig.3, è riportato l'andamento della viscosità relativa, definita come il rapporto tra la viscosità misurata della sospensione e quella del mezzo sospendente, in funzione dello *shear rate* per quattro differenti campioni. I risultati riguardanti le sospensioni di GR in plasma e soluzione salina sono assolutamente paragonabili a quelli ottenuti precedentemente da Chien. Le due curve, rispettivamente in rosso e in giallo, mostrano un andamento simile, tranne che per flussi molto deboli, quando nel plasma l'aggregazione tra cellule diventa significativa (a causa del fibrinogeno, come spiegato nell'introduzione) ed il campione diventa

maggiormente viscoso. A parte, dunque, la differenza per valori di *shear rate* inferiori a 20 s^{-1} , le due sospensioni evidenziano lo *shear-thinning* atteso. Per poter chiarire il ruolo della transizione morfologica che caratterizza i GR in presenza di un flusso crescente, abbiamo paragonato il comportamento reologico dei campioni sospesi in PBS/BSA (anche detti *washed blood*) a quello di altre due dispersioni di cellule in soluzione salina aventi lo stesso ematocrito, ma in cui i globuli sono stati precedentemente solidificati in due condizioni completamente differenti. La prima è stata preparata con globuli solidificati in condizioni statiche (discociti), la seconda con GR irrigiditi a $1,500\text{ s}^{-1}$, dunque con popolazione a maggioranza polilobata, e poi risospesi in PBS/BSA ad ematocrito pari a 45% . Entrambi i campioni "solidificati" presentano un comportamento pressoché Newtoniano, anche se, in particolare in quello composto da discociti, è misurato un aumento leggero della viscosità (*shear-thickening*) per valori di *shear* superiori a 400 s^{-1} , alla stregua di quanto è osservato per numerose sospensioni colloidali (Brown et al. 2011). Soprattutto, è da sottolineare il fatto che la viscosità delle sospensioni di discociti solidificati supera di circa il 70% quella dei GR polilobati trattati con gluteraldeide, e che, in ogni caso, entrambi i valori sono più grandi di quelli misurati per dispersioni di cellule deformabili. Un tale risultato, ci consente di avvalorare l'ipotesi secondo cui la transizione dal *tumbling* di discociti

agli stomatociti deformati fino ad arrivare, per valori di *shear rate* più elevati ($> 400 \text{ s}^{-1}$), alle forme polilobate, abbia un impatto fondamentale sull'abbattimento della viscosità del sangue in flusso. Inoltre, la differenza misurata tra sospensione di GR normali e quella di cellule polilobate rigide, ci consente di sottolineare ulteriormente la cruciale importanza della deformabilità dei globuli, che si manifesta non solo nell'acquisizione di una determinata morfologia, ma anche nell'instaurarsi di regimi dinamici di flusso stabili.

Il nostro lavoro, dunque, dimostra che lo *shear-thinning* del sangue è collegato al comportamento complesso dei globuli rossi in flusso di *shear*, il quale si manifesta attraverso una variegata distribuzione di forme per ogni prefissato valore di *shear rate*. Tale varietà in termini di morfologia e dinamica è interpretabile grazie alla mancanza di fluidità della membrana cellulare per il valore di contrasto di viscosità esplorato, che corrisponde anche a quello fisiologico. La comprensione delle dinamiche che regolano la reo-fluidificazione del sangue assume un'importanza fondamentale, non solo nell'ambito della reologia e della fisica in generale, ma anche e soprattutto per le implicazioni nel campo biologico e della medicina. Infatti, a tutt'oggi l'interpretazione di numerose funzioni fisiologiche legate al comportamento del sangue è stata incentrata sull'assunzione del *tank-treading* dei GR per flussi di *shear* intensi. Un esempio sono il rilascio di ATP per la regolazione della tensione vascolare (Forsyth et al. 2011), o il cosiddetto effetto Fåhræus-Lindqvist (Fåhræus and Lindqvist 1931), collegato alla formazione di una zona di esclusione nelle vicinanze delle pareti dei vasi in cui le cellule non fluiscono (detto *cell free layer*). I nostri risultati mettono in discussione questo modello e invitano a uno studio più approfondito e rinnovato di tali fenomeni, sia dal punto di vista sperimentale che teorico, per valori del contrasto di viscosità fisiologici. Inoltre, visto il ruolo cruciale di λ sul comportamento del sangue, è molto probabile che le transizioni morfologiche osservate possano subire variazioni in caso di patologie che modifichino il contrasto di viscosità della sospensione a causa di alterazioni della composizione del plasma, o della viscosità del citoplasma dei GR o ancora delle proprietà meccaniche della loro membrana.

3. Materiali e metodi

Per una versione più dettagliata si faccia riferimento alla sezione Materials and Methods e alle Supplemental Information di Lanotte et al. (2016).

3.1 Preparazione dei campioni

I campioni utilizzati per gli esperimenti sono stati ottenuti dalla banca locale del sangue (Etablissement Français du Sang, Montpellier, Francia). Il sangue è stato prelevato da pazienti sani e consenzienti e raccolto in sacche contenenti anticoagulante CPDA-1 (Macopharma – MSE Systems, non utilizzabili per donazioni). Al fine di preparare dispersioni a prefissate frazioni volumiche, i campioni sono stati centrifugati e risospesi o nel proprio plasma nativo con aggiunta di CPDA-1 o in soluzioni saline (PBS) arricchite con albumina bovina (BSA) in concentrazione 1 mg/mlsol. L'ematocrito è stato regolato utilizzando tubi da test stretti e graduati.

Per le osservazioni di microscopia confocale, le cellule sono state marcate con PKH26 Red Fluorescent Cell Linker (Sidma-Aldrich) seguendo il protocollo standard suggerito dal fornitore. Le soluzioni con destrano (2,000 kDa Leuconostoc spp.; Sigma-Aldrich) utilizzate per esperimenti di microfluidica e reologia sono state ottenute disciogliendo il prodotto in soluzioni di PBS a tre differenti concentrazioni: 2, 4 e 9% wt/wt. Tutte le soluzioni PBS/destrano sono state caratterizzate reologicamente, mostrando un comportamento pressoché Newtoniano. I campioni sono stati conservati in frigorifero ad una temperatura di 4°C e sono stati utilizzati entro l'intervallo temporale compreso tra 3 ore e 5 giorni dal prelievo. Prima di ogni esperimento, comunque, lo stato di salute delle cellule è stato verificato tramite previo controllo al microscopio della quantità di echinociti presenti nella sospensione.

3.2 Reologia e microfluidica

Le misure di reologia sono state effettuate sia in geometria cono-piatto che Couette con reometri a stress imposto (AR 2000; TA Instruments) a temperatura costante. Gli esperimenti di reometria e imaging combinati sono stati realizzati su sospensioni di cellule, sia diluite che concentrate, solidificando in flusso il campione tramite l'aggiunta di alcuni microlitri di soluzione concentrata di glutatione. La quantità di glutatione utilizzata è tale da provocare una solidificazione rapida e permanente (Dulinska et al. 2006). La procedura di *shear* e successivo *hardening* delle cellule è stata portata a termine, per tutti i campioni, in 2 minuti. Dopodiché, i campioni sono stati recuperati, lavati e dispersi in PBS per l'osservazione in campo chiaro (BF) e con microscopia confocale. Le immagini delle cellule irrigidite sono state acquisite su un microscopio invertito (Olympus IX71) ad alto ingrandimento (obiettivo 60x) tramite una videocamera digitale Sony XCD-X710. I dati

registrati sono stati analizzati con Matlab (versione 2011a; The MathWorks).

Le osservazioni di microfluidica sono state realizzate a 25°C in canali in vetro di sezione circolare dal diametro pari a 50 µm. L'intensità del flusso all'interno dei capillari è stata regolata attraverso un OB1 Pressure Controller (ElveFlow) capace di imporre pressioni fino a 2 bar. Le immagini ad alto ingrandimento sono state ottenute grazie ad obiettivi 60x e 100x su un microscopio invertito dotato di videocamera ad alta velocità di acquisizione (Phantom Miro M320S – Vision Research) e, successivamente, analizzate tramite un software standard per l'analisi di immagini (ImageJ).

3.3 Simulazioni numeriche

I software utilizzati per le simulazioni numeriche sono stati sviluppati personalmente dai gruppi di Montpellier (Mendez et al. 2014) e Jülich (Fedosov et al. 2010). I metodi sono illustrati nel dettaglio nella sezione Supplemental Information di Lanotte et al. (2016).

Bibliografia

- Abkarian M, Faivre M, Viallat A (2007) Swinging of red blood cells under shear flow. *Phys Rev Lett* 98:188302.
- Brown E, et al. (2011) Shear thickening and jamming in densely packed suspensions of different particle shapes. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 84:1–11.
- Chien S (1970) Shear dependence of effective cell volume as a determinant of blood viscosity. *Science* 168:977–979.
- Diez-Silva M, Dao M, Han J, Lim CT, Suresh S (2010) Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease. *MRS Bull* 35:382.
- Dulinska I, Targosz M, Strojny W, Lekka M, Czuba P, Balwierz W, Szymonski M (2006) Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. *J Biochem Biophys Methods* 66:1–11.
- Dupire J, Socol M, Viallat A (2012) Full dynamics of a red blood cell in shear flow. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:20808–20813.
- Fåhræus R, Lindqvist T (1931) The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *Am J Physiol* 96:562–568.
- Fedosov DA, Caswell B, Karniadakis GE (2010) A multiscale red blood cell model with accurate mechanics, rheology, and dynamics. *Biophys J* 98:2215–2225.
- Fischer TM, Schmid-Schönbein H (1977) Tank tread motion of red-cell membranes in viscometric flow-behavior of intracellular and extracellular markers (with film). *Red Cell Rheology* (Springer, New York), pp 347–361.
- Fischer TM, Stöhr-Lissen M, Schmid-Schönbein H (1978) The red cell as a fluid droplet: Tank tread-like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow. *Science* 202:894–896.
- Forsyth AM, Wan J, Owrutsky PD, Abkarian M, Stone HA (2011) Multiscale approach to link red blood cell dynamics, shear viscosity, and ATP release. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:10986–10991.
- Goldsmith HL, Marlow J (1972) Flow behaviour of erythrocytes. I. Rotation and deformation in dilute suspensions. *Proc R Soc B* 182:351–384.
- Lanotte L, Mauer J, Mendez S, Fedosov DA, Fromental J-M, Claveria V, Nicoud F, Gompper G, and Abkarian M (2016) Red cells' dynamic morphologies govern blood shear thinning under microcirculatory flow conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* vol. 113 no. 47 13289-13294. doi: 10.1073/pnas.1608074113
- Mendez S, Gibaud E, Nicoud F (2014) An unstructured solver for simulations of deformable particles in flows at arbitrary Reynolds numbers. *J Comput Phys* 256:465.
- Wells RE, Merrill EW (1961) Shear rate dependence of the viscosity of whole blood and plasma. *Science* 133:763–764.
- Wells R, Schmid-Schönbein H (1969) Red cell deformation and fluidity of concentrated cell suspensions. *J Appl Physiol* 27:213–217.