- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.91 Sun, 06 Jul 2025, 22:08:34

Ipotesi di lavoro

Trombolisi accelerata dagli ultrasuoni e dalle microbolle

Daniele Rovai, Giuseppina Basta, Guido Lazzerini, Claudio Domenici, Piero Chiarelli, Maria-Aurora Morales, Antonio L'Abbate*

*Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, *Scuola Superiore S. Anna, Pisa*

Key words:
Echocontrast; Thrombolysis; Thrombosis; Ultrasound.

Therapeutic applications of ultrasound are currently limited to dental plaque removal, physiotherapy and lithotripsy. However, several *in vitro* and experimental studies have shown the ability of ultrasound to accelerate clot dissolution. This effect is mainly influenced by the intensity and frequency of the beam. High ultrasound energies, although effective, can induce early reocclusion, while moderate intensities and low ultrasound frequencies are better tolerated and equally effective. So far, few patients with acute myocardial infarction have been treated by ultrasound catheters. In patients with ischemic stroke, transcranial Doppler was monitored during the venous administration of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) and the occluded vessel was recanalyzed earlier than in other studies by rt-PA alone (without Doppler monitoring).

Ultrasound-accelerated thrombolysis is caused by a strengthening of the enzymatic action, favored by acoustic cavitation. As the microbubbles of echocontrast agents lower the cavitation threshold, they can further enhance the thrombolytic process. New generation microbubbles, able to bind to the thrombus surface, could facilitate thrombus-microbubbles interaction. The combination of ultrasound, microbubbles and fibrinolytic agents could benefit the treatment of a variety of cardiovascular diseases.

(Ital Heart J Suppl 2003; 4 (5): 407-414)

© 2003 CEPI Srl

Il presente lavoro fa parte del progetto FIRB "Tecniche e metodiche per l'utilizzo dei mezzi di contrasto ecografici in applicazioni diagnostiche e terapeutiche" del MIUR.

Ricevuto il 15 gennaio 2003; nuova stesura il 30 aprile 2003; accettato il 5 maggio 2003.

Per la corrispondenza:

Dr. Daniele Rovai

Istituto di Fisiologia Clinica del CNR
Area della Ricerca
Via Moruzzi, 1
56124 Pisa
E-mail: drovai@ifc.cnr.it

Introduzione

L'ampia diffusione degli ultrasuoni a scopo diagnostico è in buona parte legata ai loro limitati effetti biologici. Variando l'intensità, la frequenza e le modalità di esposizione agli ultrasuoni, è tuttavia possibile ottenere significativi effetti biologici, che possono essere sfruttati a scopo terapeutico. Le potenziali applicazioni terapeutiche degli ultrasuoni furono esplorate per la prima volta da Lynn et al.[1] nel 1942; essi mostrarono che ultrasuoni focalizzati e ad elevata intensità possono provocare un danno tissutale nel punto focale, senza produrre effetti nocivi alla superficie del corpo e nei tessuti circostanti. Alcune applicazioni terapeutiche degli ultrasuoni sono normalmente utilizzate in medicina, come la rimozione della placca dentale o la litotripsia dei calcoli renali, mentre altre sono allo studio. Esse includono la possibilità di stimolare la riparazione tissutale e la cicatrizzazione delle ferite, di favorire la riparazione delle fratture, di ablare selettivamente i tessuti sfruttando l'effetto termico degli ultrasuoni, di rompere microbolle contenenti farmaci per liberarne il contenuto nel tessuto o nell'organo bersaglio o di favorire la trombolisi[2]. Le capacità degli ultrasuoni di accelerare la dissoluzione dei trombi sono state esplorate oltre 10 anni fa[3], ma l'interesse in questo settore è andato crescendo recentemente, quando è stato visto che le microbolle contenute negli agenti di contrasto ecografici possono ulteriormente accelerare la dissoluzione dei trombi in presenza di ultrasuoni[4]. Lo scopo di questo lavoro è di mettere a fuoco quanto è noto sulla trombolisi accelerata dagli ultrasuoni e dalle microbolle. Poiché le caratteristiche del fascio ultrasonico giocano un ruolo fondamentale in questo campo, seguiranno brevi cenni di fisica.

Caratteristiche delle onde acustiche

I suoni sono onde meccaniche di compressione e rarefazione che attraversano un mezzo di propagazione. I suoni sono udibili dall'orecchio umano e hanno una frequenza compresa fra 20 e 20 000 cicli/s o Hertz (Hz). Gli ultrasuoni e gli infrasuoni sono anch'essi onde meccaniche di compressione e rarefazione, ma hanno una fre-

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.91 Sun, 06 Jul 2025, 22:08:34

quenza non udibile dall'orecchio umano: > 20 000 Hz per gli ultrasuoni e < 20 Hz per gli infrasuoni. Come illustrato in figura 1, un fascio ultrasonico contiene onde di compressione e rarefazione sia longitudinali (nel senso di propagazione del fascio) che trasversali (perpendicolari cioè alla direzione di propagazione), come quelle di una corda tesa ai due estremi e pizzicata.

In ecografia diagnostica la frequenza del fascio ultrasonico, solitamente di milioni di Hz o MegaHertz (MHz), gioca un ruolo fondamentale nell'influenzare la qualità delle immagini. Nell'uso terapeutico degli ultrasuoni l'energia del fascio (emesso dalla combinazione ecografo-trasduttore) gioca un ruolo altrettanto rilevante. Per descrivere questa caratteristica vengono usati termini diversi, che non sono sinonimi: pressione acustica, potenza e intensità acustica[5]. La pressione acustica è il grado di compressione e rarefazione cui è sottoposto un mezzo attraversato da un'onda acustica, essa si misura mediante sensori miniaturizzati detti idrofoni. Per descrivere la pressione acustica vengono misurati il picco di pressione positivo e negativo dell'onda acustica e la loro differenza, come illustrato in figura 2. Il valore di picco positivo o negativo esprime la massima escursione della pressione rispetto alla pressione statica del mezzo. La pressione acustica si misura in Newton/m^2 o Pascal (Pa); essa è massima in prossimità della zona focale e la sua misura consente di valutare le forze che agiscono sul mezzo attraversato dagli ultrasuoni. A causa di queste forze, il fascio ultrasonico trasferisce energia (che si misura in Joule-J) ai mezzi nei quali si propaga, verosimilmente a causa di spostamenti istantanei di particelle dalla loro posizione di equilibrio. La capacità di trasferire energia in un certo intervallo di tempo è detta potenza e si misura in Watt (W), essendo 1 W uguale a 1 J/s. La potenza è quindi una funzione del fascio nella sua totalità. L'intensità del fascio è invece la potenza che attraversa un'area unitaria in una certa direzione, ed è quindi uguale al rapporto fra potenza e area irraggiata dal trasduttore. L'intensità si misura in W/cm^2 ed è massima nella zona focale.

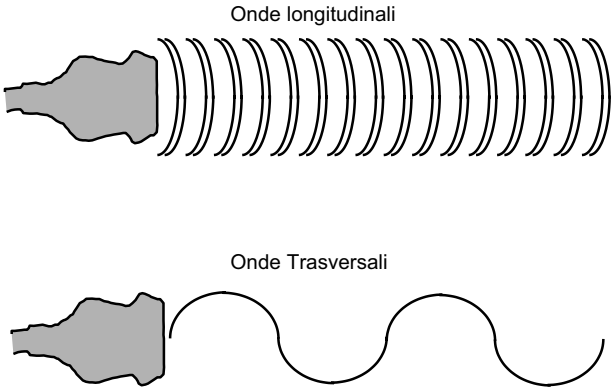

Figura 1. *Rappresentazione schematica delle onde di compressione e rarefazione presenti in un fascio ultrasonico. Il* pannello superiore *mostra le onde longitudinali (nel senso di propagazione del fascio) e quello* inferiore *le onde trasversali (perpendicolari alla direzione di propagazione).*

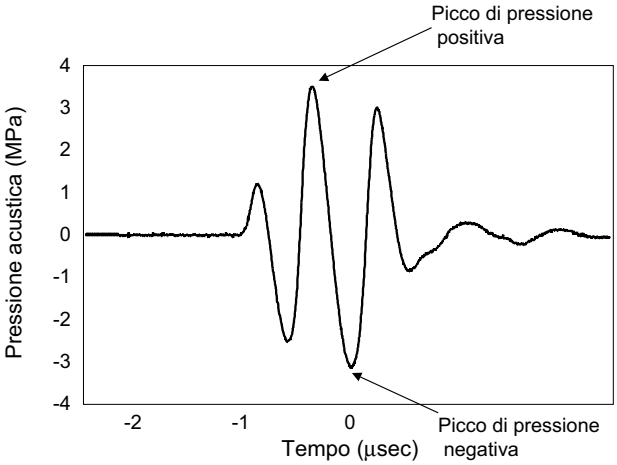

Figura 2. *Onda acustica generata da un ecografo commerciale e misurata mediante idrofono. Le* frecce *indicano i picchi di pressione positiva e negativa. MPa = MegaPascal.*

Quando gli ultrasuoni si propagano in un mezzo, l'ampiezza dell'onda acustica si riduce progressivamente e parte della sua energia viene trasferita al mezzo sotto forma di calore. Questo fenomeno prende il nome di effetto termico ed è influenzato sia dalle caratteristiche del fascio ultrasonico che da quelle dei tessuti attraversati. L'effetto termico è infatti legato allo spostamento istantaneo di particelle dalla loro posizione di equilibrio, ed è tanto maggiore quanto più elevata è l'ampiezza delle oscillazioni acustiche e quanto più alta è la frequenza; frequenze elevate inducono infatti spostamenti di particelle più veloci rispetto a quelle più basse. Sul piano biologico, l'effetto termico varia con la viscosità dei tessuti, in quanto un'elevata viscosità determina una maggiore resistenza al movimento delle particelle; per questo motivo l'effetto termico degli ultrasuoni è maggiore nell'osso che nei tessuti molli. Bisogna infine prendere in considerazione la durata dell'esposizione agli ultrasuoni, dato che intensità acustiche anche elevate possono essere tollerate purché il tempo di esposizione sia breve.

Gli ultrasuoni possono indurre effetti biologici indesiderati ed in particolare la cavitazione, cioè la formazione di microbolle durante la fase negativa dell'onda pressoria, ovvero durante la fase di rarefazione. Al fine di fornire al clinico informazioni sull'energia emessa dal fascio ultrasonico e sul possibile rischio di cavitazione, l'American Institute of Ultrasound in Medicine ha introdotto l'indice meccanico o di cavitazione, il cui valore è rappresentato sullo schermo degli ecografi più recenti[6]. La possibilità di dare o meno origine a fenomeni di cavitazione dipende dalla durata ed intensità della fase di rarefazione dell'onda acustica e dalle caratteristiche del mezzo. Poiché la durata della fase di rarefazione è inversamente proporzionale alla frequenza del fascio ultrasonico, i fenomeni di cavita-

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.91 Sun, 06 Jul 2025, 22:08:34

zione sono tanto più probabili quanto più bassa è la frequenza ultrasonica. Sul piano concettuale l'indice meccanico è il rapporto fra il picco di pressione acustica negativa e la radice quadrata della frequenza centrale del trasduttore. I valori degli indici termico e meccanico riportati sullo schermo dell'ecografo rappresentano pertanto dei valori medi, ottenuti in acqua e in modelli di tessuto. Questi valori possono dare l'idea che gli effetti biologici degli ultrasuoni siano legati esclusivamente alla strumentazione. Tuttavia, il reale incremento di temperatura *in vivo* può in alcuni casi superare il valore di indice termico mostrato sull'ecografo e, parimenti, la probabilità di generare un danno biologico nei vari tessuti e alle varie distanze dalla sonda può discostarsi dal valore di indice meccanico "medio" rappresentato sull'ecografo. Infine, è essenziale ricordare che la soglia di cavitazione si abbassa se nel mezzo esposto al fascio ultrasonico sono presenti microbolle gassose, contenute nei mezzi di contrasto per ecografia, che sono instabili, vanno incontro a oscillazioni e poi implodono.

Come sopra riportato, la diagnostica ad ultrasuoni sfrutta essenzialmente onde longitudinali, in grado di esercitare una pressione acustica che solitamente varia fra 1 e 8 MegaPascal (MPa), ed un'intensità acustica tipicamente < 0.72 W/cm^2 (Tab. I). Questa è infatti l'intensità massima erogabile in diagnostica secondo quanto stabilito dalla Food and Drug Administration. Nella diagnostica ultrasonica l'effetto termico è trascurabile. Gli strumenti utilizzati in fisioterapia consentono invece di ottenere un discreto riscaldamento tissutale, in quanto si basano sulle onde trasversali (Fig. 1). In fisioterapia l'effetto termico è dovuto all'elevata ampiezza delle oscillazioni trasversali, ottenibile senza grosse variazioni della pressione acustica. In fisioterapia l'intensità del fascio può raggiungere i 10 W/cm^2, mentre la pressione acustica è bassa (0.1-0.7 MPa). Negli strumenti utilizzati per la litotripsia non si vuole riscaldare il tessuto, per cui l'intensità del fascio ultrasonico è bassa come negli ecografi diagnostici. Volendo invece effettuare un'azione "meccanica" tale da poter dissolvere bersagli consistenti come i calcoli, vengono utilizzate onde trasversali con picchi di pressione acustica molto elevata (10-100 MPa).

Tabella I. Rapporti fra frequenza, intensità, potenza e pressione acustica negli strumenti ad ultrasuoni utilizzati in diagnostica, fisioterapia e litotripsia.

	Diagnostica	Fisioterapia	Litotripsia
Frequenza (MHz)	1.5-10	0.75-3	0.2-0.9
Intensità (W/cm^2)	0.3-0.75	0.02-10	0.01-0.1
Potenza (W)	0.02-0.25	0.1-15	0.001-0.05
Pressione acustica (MPa)	1-8	0.1-0.7	10-100

MHz = MegaHertz; MPa = MegaPascal; W = Watt.

Trombolisi accelerata dagli ultrasuoni

Diversi studi hanno dimostrato che gli ultrasuoni sono in grado di accelerare la dissoluzione dei coaguli. Le principali variabili che influenzano l'efficacia e la sicurezza di questo approccio sono la frequenza e l'intensità del fascio ultrasonico. Gli ultrasuoni ad alta frequenza (MHz), utilizzati a scopo diagnostico, sono in grado di accelerare la dissoluzione dei coaguli *in vitro*[7-11] ed in modelli animali di trombosi arteriosa[12,13]. Questo effetto terapeutico è tuttavia molto modesto o nullo quando l'intensità del fascio ultrasonico è nel range utilizzato a scopo diagnostico, ma aumenta con il crescere dell'intensità. L'aumento dell'intensità determina però il riscaldamento dei tessuti circostanti[14,15] e la formazione di radicali liberi[16]. Così, in un preparato di trombosi dell'arteria femorale nel coniglio, ultrasuoni ad alta frequenza (1 MHz) ed elevata intensità (6.3 W/cm^2) hanno accelerato la ricanalizzazione, a prezzo però di una più elevata incidenza di riocclusione[12]. Questi dati non debbono indurre preoccupazioni nell'uso clinico degli ultrasuoni, in quanto le intensità utilizzate in diagnostica sono di ben 10 volte inferiori. Nell'intento di somministrare ultrasuoni nella sede dell'occlusione, limitando l'esposizione dei tessuti circostanti, trasduttori miniaturizzati sono stati montati su cateteri per uso endovascolare[17,18]. Questo trattamento invasivo può però determinare un effetto termico eccessivo, con danno della parete vasale ed embolizzazione di frammenti del trombo[19,20].

Per superare questi limiti sono stati utilizzati ultrasuoni a bassa frequenza (nell'ordine dei chiloHertz-kHz), nell'ipotesi che essi producano un minore riscaldamento tissutale e una migliore penetrazione in profondità. L'energia ultrasonica viene infatti assorbita dal tessuto ad ogni ciclo, così che l'assorbimento (e con esso l'effetto termico) aumentano con l'aumentare del numero di cicli/s, cioè della frequenza. Di nuovo, sia gli effetti terapeutici che quelli indesiderati sono risultati fortemente dipendenti dall'intensità del fascio ultrasonico. Quando un trasduttore terapeutico a bassa frequenza (500 kHz) ed intensità molto elevata (35 W/cm^2) è stato utilizzato per lisare coaguli inseriti in segmenti di arteria bovina, l'efficacia della trombolisi è risultata elevata, ma l'esposizione agli ultrasuoni per tempi > 5 min ha causato un danno della parete arteriosa, *in vitro*[13].

Gli ultrasuoni a bassa frequenza ed intensità moderatamente elevata sono meglio tollerati. In un modello di trombosi, che mima *in vitro* un'occlusione vascolare intracranica, il tempo alla ricanalizzazione del vaso è risultato più breve utilizzando attivatore tissutale del plasminogeno ricombinante (rt-PA) ed ultrasuoni a bassa frequenza (185 kHz) ed intensità moderatamente elevata (2.0 W/cm^2) che non rt-PA ed ultrasuoni convenzionali o rt-PA da solo (Fig. 3)[21]. Per valutare la sicurezza di questo approccio, il cervello di ratto è stato esposto ad ultrasuoni ad intensità moderatamente elevata per 90 min, senza che la barriera emato-encefalica

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.91 Sun, 06 Jul 2025, 22:08:34

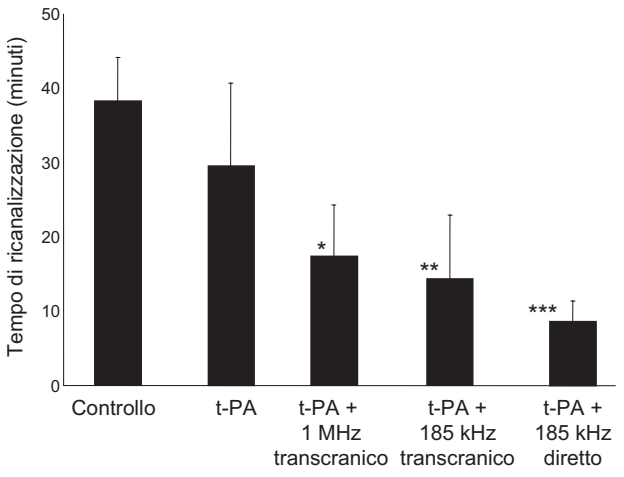

Figura 3. *Confronto fra il tempo di ricanalizzazione in un modello di flusso* in vitro *che mima un'occlusione vascolare intracranica. Il gruppo di controllo non ha ricevuto alcun trattamento ed ha mostrato il tempo di ricanalizzazione più lungo. Si noti l'effetto dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) e della sua associazione con ultrasuoni somministrati alla frequenza di 1 MegaHertz (MHz) e di 185 chiloHertz (kHz) per via transcranica, o di 185 kHz per applicazione diretta. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 rispetto al gruppo trattato con solo t-PA. Da Behrens et al.[21], modificata.*

risultasse danneggiata. In questo preparato la teca cranica può aver assorbito l'intensità del fascio ultrasonico, limitando così gli effetti indesiderati.

Anche gli ultrasuoni a bassa frequenza e bassa intensità accelerano la trombolisi enzimatica[22]. Come illustrato in figura 4[23], la lisi è già accelerata alle intensità comunemente utilizzate in diagnostica (0.25-0.5 W/cm^2), che producono solo un modesto effetto termico. In un modello di trombosi dell'arteria femorale del coniglio gli stessi autori hanno ottenuto una modesta riperfusione utilizzando la streptochinasi e ultrasuoni separatamente, ma una riperfusione pressoché completa combinando i due trattamenti per 2 ore[23]. In questo studio il riscaldamento tissutale è risultato modesto, ma l'esame microscopico ha evidenziato una tendenza verso la vacuolizzazione dell'endotelio, il distacco di alcune cellule dalla membrana basale con un'occasionale adesione di eritrociti alla membrana basale.

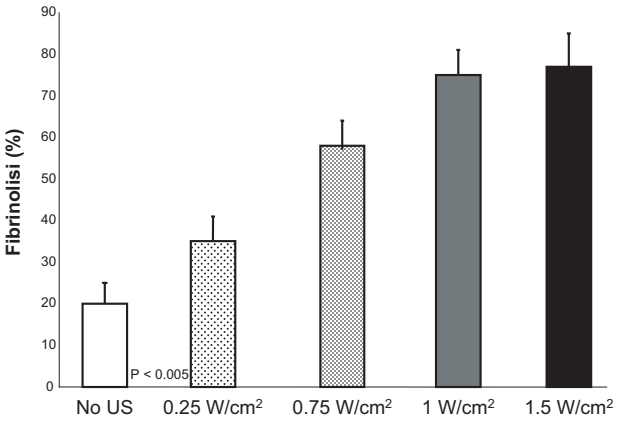

Figura 4. *Effetto dell'intensità del fascio ultrasonico sulla fibrinolisi indotta dall'attivatore tissutale del plasminogeno (1 μg/ml). Gli ultrasuoni (US) sono stati generati da una sonda a bassa frequenza (40 chiloHertz). W = Watt. Da Suchkova et al.[23], modificata.*

Un altro parametro ultrasonico che influenza la trombolisi è la modalità di emissione dell'energia ultrasonora. Gli ultrasuoni ad onda continua accelerano la fibrinolisi più di quelli ad onda pulsata[24]. Al fine di limitare l'esposizione dei tessuti biologici agli ultrasuoni, la maggior parte degli autori utilizza tuttavia ultrasuoni ad onda pulsata. Infine, oltre ad un effetto additivo a quello dei fibrinolitici, gli ultrasuoni hanno anche un modesto effetto diretto sulla dissoluzione dei trombi, dimostrato *in vitro* utilizzando ultrasuoni ad onda continua, a bassa frequenza (20 kHz) ed intensità comprese fra 0.15 e 1.3 W/cm^2 [25,26].

Meccanismo d'azione degli ultrasuoni sulla dissoluzione dei trombi

Svariati fattori possono contribuire ad accelerare la dissoluzione dei trombi mediante ultrasuoni. Questo fenomeno non sembra legato ad un meccanismo termico, cioè all'aumento di temperatura indotto dall'assorbimento degli ultrasuoni[27], essendo stato osservato anche in esperimenti nei quali l'aumento di temperatura era minimo. In aggiunta, il tempo di ricanalizzazione *in vitro* di vasi trombizzati non è influenzato dalla temperatura in un intervallo compreso fra 35 e 45°C, mentre al di sopra di questa temperatura la fibrinolisi addirittura rallenta[11]. Analogamente, la dissoluzione dei trombi non sembra legata alla loro rottura meccanica da parte degli ultrasuoni, che si realizza solo ad intensità molto elevate o per applicazioni dirette degli ultrasuoni come nel caso di trasduttori montati su cateteri intravascolari[17,18,28]. L'accelerazione della trombolisi sembra invece dovuta ad un potenziamento dell'azione enzimatica, favorita da fenomeni di cavitazione acustica.

Per effetto delle onde ultrasoniche di compressione e rarefazione si possono formare nei liquidi delle microscopiche bolle gassose. Questo fenomeno può essere transitorio (cavitazione inerziale) o stabile (cavitazione non inerziale). Nel primo caso si formano microbolle a vita molto breve, che vanno incontro a grossolani cambiamenti di volume e poi implodono, liberando così grandi quantità di energia sotto forma di calore o di pressione[29,30]. Le microbolle possono anche disintegrarsi in microbolle più piccole, che possono dissolversi o costituire ulteriori nuclei di cavitazione, che liberano energia. Questa energia da origine a getti ad alta velocità all'interno del liquido, detti microcorrenti. Se la pressione acustica è al di sotto di una certa soglia si ha la cavitazione non inerziale, per la quale le microbolle prodotte dagli ultrasuoni vibrano, emettendo così onde pressorie per un certo numero di cicli e producendo movimenti circolatori nel fluido circostante, che di nuovo danno vita a microcorrenti. Nei due casi le microcorrenti migliorano la biodisponibilità dei fibrinoli-

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.91 Sun, 06 Jul 2025, 22:08:34

tici alla superficie dei trombi, esponendo una maggiore superficie del trombo agli agenti litici[31]. Secondo altri autori i fibrinolitici e gli ultrasuoni agirebbero in maniera congiunta, e gli effetti degli ultrasuoni possono essere osservati solo dopo che la rete di fibrina è stata indebolita con un meccanismo proteolitico. Una variabile biologica è infine rappresentata dalla consistenza dei trombi, che aumenta con il passare del tempo a causa della retrazione del coagulo. In accordo, l'accelerazione della trombolisi ad opera degli ultrasuoni è maggiore nei trombi freschi che in quelli vecchi[11].

Esperienze cliniche preliminari

L'accelerazione della trombolisi ad opera degli ultrasuoni potrebbe essere di utilità clinica in una varietà di pazienti, come quelli affetti da trombosi venosa profonda, da arteriopatie periferiche, da ictus o da infarto miocardico acuto. Le esperienze cliniche sono però attualmente molto limitate. Nello studio ACUTE[32] è stata valutata l'efficacia della trombolisi mediante catetere ad ultrasuoni in 15 pazienti con infarto miocardico acuto anteriore. In questo studio la dissoluzione del trombo mediante ultrasuoni non è stata quindi complementare alla lisi farmacologica, ma alternativa. Questo approccio invasivo ha consentito di ottenere una riperfusione efficace, con flusso TIMI 3, in 13 pazienti (87%), che furono poi sottoposti ad angioplastica con palloncino ottenendo una stenosi residua del 20%. Dieci minuti dopo la trombolisi ad ultrasuoni, tuttavia, un paziente presentò una riocclusione coronarica asintomatica, che rese necessaria una seconda angioplastica ottenendo un flusso TIMI 2. In quinta giornata un altro paziente presentò ischemia miocardica ricorrente e la coronarografia d'urgenza rivelò l'occlusione del vaso trattato, che fu ricanalizzato efficacemente mediante angioplastica. Questi risultati, pur mostrando che la trombolisi può essere ottenuta nell'uomo mediante catetere ad ultrasuoni, non evidenziano sostanziali vantaggi rispetto alle procedure convenzionali di rivascolarizzazione per via percutanea. Sembra inoltre legittimo il sospetto che l'energia ultrasonica possa avere effetti nocivi sulla parete arteriosa, tali da favorire la riocclusione coronarica. In un altro studio sono stati trattati 14 pazienti con infarto miocardico acuto da occlusione della coronaria destra (4 pazienti), della circonflessa (2 pazienti) o della discendente anteriore (8 pazienti)[33]. Dopo trombolisi con ultrasuoni e angioplastica con palloncino fu ottenuto un flusso TIMI 3 in 13 pazienti. Due pazienti presentarono un'embolizzazione distale e 5 ebbero dissezioni minori, che non limitavano il flusso.

Al fine di ridurre al minimo le conseguenze cliniche e neurologiche dell'ictus ischemico, che è causato dall'occlusione trombotica o embolica di un'arteria cerebrale, il vaso deve essere ricanalizzato non appena possibile[34]. L'unica terapia attualmente accettata a questo scopo è l'rt-PA somministrato entro 3 ore dall'insorgenza dei sintomi[35,36]. Con questa terapia il vaso responsabile dell'ictus viene ricanalizzato in una percentuale di casi limitata[37,38]. Per migliorare l'efficacia della trombolisi nell'ictus ischemico acuto è stato proposto di associare il trattamento con ultrasuoni per via transcranica. Un gruppo di 40 pazienti con ictus ischemico acuto furono trattati con infusione di attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA)[39]. Al fine di identificare la sede dell'occlusione arteriosa e di monitorare la ricanalizzazione del vaso durante la fibrinolisi, tutti i pazienti furono studiati con Doppler transcranico, che fu monitorato per tutta la durata dell'infusione di t-PA. La ricanalizzazione si verificò piuttosto precocemente (45 ± 20 min dopo il bolo di t-PA). Alla fine dell'infusione il 30% dei pazienti presentarono un netto miglioramento o un recupero completo; dopo 24 ore questa percentuale era salita al 40%, e il 62% dei pazienti presentava un miglioramento almeno moderato. Purtroppo in questo studio manca un gruppo di controllo che includa pazienti trattati con rt-PA senza monitoraggio Doppler. Questa efficacia terapeutica sembra tuttavia superiore a quella riportata da altri studi, nei quali a 24 ore solo il 27% dei pazienti trattati con t-PA e il 12% di quelli trattati con placebo presentava un netto miglioramento e il 47% un miglioramento parziale[36,37]. Sebbene le differenze nella dimensione del campione e nei regimi di trattamento impediscano un confronto diretto fra i vari studi, queste osservazioni suggeriscono che la trasmissione di energia ultrasonica mediante il Doppler transcranico possa aver favorito la fibrinolisi *in vivo*, mediante l'esposizione di una maggiore superficie del trombo all'agente farmacologico.

Effetto delle microbolle gassose

Come sopra ricordato, gli ultrasuoni facilitano la trombolisi enzimatica verosimilmente mediante un fenomeno di cavitazione acustica. Le microbolle gassose, contenute negli agenti di contrasto per ecografia, abbassano la soglia di cavitazione, implodendo ad un'intensità ultrasonica più bassa di quelle generate per effetto degli ultrasuoni stessi[4]. È stato recentemente dimostrato che fenomeni di cavitazione si realizzano anche all'interno del miocardio durante ecocontrastografia utilizzando un trasduttore commerciale operante a 1.7 MHz ed a basso indice meccanico[40].

Le prime evidenze che le microbolle possono ulteriormente accelerare la fibrinolisi facilitata dagli ultrasuoni risalgono al 1995[4] e al 1996[41]. Trombi generati *in vitro* sono stati trattati con urochinasi, con urochinasi ed ultrasuoni a bassa frequenza (170 kHz) e bassa intensità (0.5 W/cm^2) e con l'ulteriore aggiunta di microbolle di albumina contenenti aria atmosferica, presenti nell'agente di contrasto Albunex. La fibrinolisi con urochinasi è risultata accelerata dagli ultrasuoni, ma ancor più quando agli ultrasuoni sono state associate le microbolle di albumina (Fig. 5)[4].

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.91 Sun, 06 Jul 2025, 22:08:34

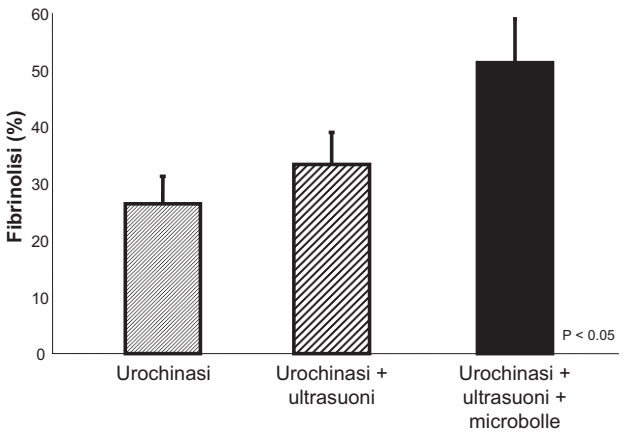

Figura 5. *Effetto degli ultrasuoni e delle microbolle di Albunex sulla trombolisi da urochinasi. Da Tachibana e Tachibana[4], modificata.*

Svariati studi hanno dimostrato che il contenuto gassoso delle microbolle influenza marcatamente l'accelerazione della fibrinolisi in presenza di ultrasuoni[42-44]. Negli agenti di contrasto della prima generazione le microbolle contengono aria atmosferica e favoriscono la fibrinolisi in misura moderata. Negli agenti della seconda generazione le microbolle contengono invece gas ad alta densità e scarsamente solubili nel sangue, che rendono le microbolle più stabili. Queste microbolle sono pertanto distrutte dagli ultrasuoni con maggiore difficoltà, ma la loro implosione dà origine a fenomeni meccanici più marcati e ad un potenziamento della fibrinolisi più evidente. È infine affascinante l'ipotesi di lavoro che microbolle della terza generazione, alla cui superficie sono stati coniugati leganti o anticorpi contro antigeni presenti sui trombi[45,46], possano essere somministrati in vena e possano verniciare la superficie dei trombi, favorendone così la rivelazione mediante ultrasuoni e la dissoluzione mediante trasduttori terapeutici. Microbolle della terza generazione, in grado di aderire a bersagli specifici, sono state anche proposte per realizzare una sorta di "consegna a domicilio" di farmaci contenuti all'interno delle microbolle e liberati in sede per effetto degli ultrasuoni stessi[47-49].

Studi sperimentali hanno anche dimostrato che le microbolle in presenza di ultrasuoni possono dissolvere il trombo in modo diretto e indipendente dalla somministrazione di fibrinolitici. In un preparato animale di trombosi dell'arteria ileo-femorale del coniglio[50] il 76% delle arterie furono ricanalizzate mediante iniezione intrarteriosa di microbolle ed esposizione agli ultrasuoni per via percutanea, utilizzando una sonda a bassa frequenza (24 kHz) ed elevata intensità (2.9 W/cm^2). La ricanalizzazione fu però ottenuta a prezzo di un aumento della temperatura locale (4°C), di un'accentuata aggregazione piastrinica alla superficie dei trombi e di lesioni delle cellule endoteliali con formazione di vacuoli e parziale distacco dalla membrana basale. In un preparato animale simile[40] tutte le arterie ileo-femorali trattate con microbolle per via endovenosa ed ultrasuoni per via percutanea sono risultate pervie, mentre sono rimaste occluse tutte le arterie controlaterali trattate con microbolle o ultrasuoni separatamente. Anche in questo studio fu utilizzato un generatore di ultrasuoni a bassa frequenza (37 kHz) ed elevata intensità (picco di pressione negativo 103 chiloPascal), ma non fu osservato alcun effetto termico locale grazie ad un sistema di raffreddamento sulla superficie cutanea.

Conclusione e prospettive

Gli ultrasuoni sono in grado di accelerare la lisi dei coaguli sia *in vitro* che in preparati animali. Questi effetti terapeutici sono influenzati da una varietà di fattori fisici che includono, oltre alla frequenza del fascio ultrasonico, la sua energia. Energie elevate sono sicuramente efficaci ma producono effetti biologici indesiderati sulla parete vasale, che possono portare ad una riocclusione precoce. Energie troppo basse possono essere inefficaci. Le microbolle gassose – contenute negli agenti di contrasto per ecografia – abbassano la soglia di cavitazione così che gli effetti terapeutici degli ultrasuoni possono comparire anche con bassi livelli di energia acustica. È affascinante pensare che la combinazione di ultrasuoni e microbolle possa consentire di potenziare gli effetti della terapia fibrinolitica in una varietà di malattie vascolari, che potrebbe andare dalla trombosi venosa profonda fino all'infarto miocardico acuto e all'ictus ischemico.

Riassunto

Le applicazioni terapeutiche degli ultrasuoni sono attualmente limitate alla rimozione della placca dentale, alla fisioterapia ed alla litotripsia. Svariati studi hanno però dimostrato la capacità di accelerare la trombolisi mediante ultrasuoni, sia *in vitro* che in preparati animali di trombosi arteriosa. Questo effetto è influenzato prevalentemente dall'energia e dalla frequenza del fascio ultrasonico. Energie elevate sono efficaci, ma possono causare una riocclusione precoce; intensità moderatamente elevate e basse frequenze ultrasoniche sono meglio tollerate. Le esperienze cliniche sono limitate al trattamento di pochi pazienti con infarto miocardico acuto mediante catetere ad ultrasuoni. In pazienti con ictus ischemico il Doppler transcranico è stato monitorato durante la somministrazione endovenosa di attivatore tissutale del plasminogeno ricombinante (rt-PA) e la ricanalizzazione del vaso si è verificata più precocemente di quanto riportato in altri studi con il solo rt-PA (senza monitoraggio Doppler). L'accelerazione della trombolisi mediante ultrasuoni è legata ad un potenziamento dell'azione enzimatica, favorita da fenomeni di cavitazione acustica. Poiché le microbolle gassose contenute negli agenti di ecocontrasto abbassano la soglia

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.91 Sun, 06 Jul 2025, 22:08:34

di cavitazione acustica, esse accelerano ulteriormente la trombolisi. Questo fenomeno potrebbe essere ulteriormente potenziato utilizzando nuove generazioni di microbolle, capaci di aderire alla superficie dei trombi. La combinazione di ultrasuoni, microbolle e di fibrinolitici potrebbe essere di ausilio in una varietà di malattie cardiovascolari.

Parole chiave: Ecocontrasto; Trombolisi; Trombosi; Ultrasuoni.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano l'Ingegner Massimo Polignano della Esaote per la revisione del manoscritto e per le misurazioni illustrate in figura 2.

Bibliografia

1. Lynn JG, Zwemer RL, Chick AJ, et al. A new method for the generation and use of focused ultrasound in experimental biology. J Gen Physiol 1942; 26: 179-93.
2. Siegel RJ. Therapeutic ultrasound, part I. Echocardiography 2001; 18: 211-2.
3. Kudo S. Thrombolysis with ultrasound effect. Tokyo Jikeikai Med J 1989; 104: 1005-12.
4. Tachibana K, Tachibana S. Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. Circulation 1995; 92: 1148-50.
5. Preston RC. Safety of diagnostic ultrasonic equipment: the relevance of acoustic output information to the clinical user. In: Preston RC, ed. Output measurements for medical ultrasound. London: Springer-Verlag, 1991: 5-18.
6. Discussion of the mechanical index and other exposure parameters. American Institute of Ultrasound in Medicine. J Ultrasound Med 2000; 19: 143-8.
7. Lauer CG, Burge R, Tang DB, Bass BG, Gomez ER, Alving BM. Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis. Circulation 1992; 86: 1257-64.
8. Francis CW, Önundarson PT, Carstensen EL, et al. Enhancement of fibrinolysis in vitro by ultrasound. J Clin Invest 1992; 90: 2063-8.
9. Blinc A, Francis CW, Trudnowski JL, Carstensen EL. Characterization of ultrasound-potentiated fibrinolysis in vitro. Blood 1993; 81: 2636-43.
10. Luo H, Steffen W, Cercek B, Arunasalam S, Maurer G, Siegel RJ. Enhancement of thrombolysis by external ultrasound. Am Heart J 1993; 125: 1564-9.
11. Olsson SB, Johansson B, Nilsson AM, Olsson C, Roijer A. Enhancement of thrombolysis by ultrasound. Ultrasound Med Biol 1994; 20: 375-82.
12. Kornowski R, Meltzer RS, Chernine A, Vered Z, Battler A. Does external ultrasound accelerate thrombolysis? Results from a rabbit model. Circulation 1994; 89: 339-44.
13. Rosenschein U, Furman V, Kerner E, Fabian I, Bernheim J, Eshel Y. Ultrasound imaging-guided noninvasive ultrasound thrombolysis: preclinical results. Circulation 2000; 102: 238-45.
14. Bacon DR, Carstensen EL. Increased heating by diagnostic ultrasound due to nonlinear propagation. J Acoust Soc Am 1990; 88: 26-34.
15. Hartman CL, Child SZ, Penney DP, Carstensen EL. Ultrasonic heating of lung tissue. J Acoust Soc Am 1992; 91: 513-6.
16. Riesz P, Kondo T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. Free Radic Biol Med 1992; 13: 247-70.
17. Sehgal CM, Leveen RF, Shlansky-Goldberg RD. Ultrasound-assisted thrombolysis. Invest Radiol 1993; 28: 939-43.
18. Shlansky-Goldberg RD, Cines DB, Sehgal CM. Catheter-delivered ultrasound potentiates in vitro thrombolysis. J Vasc Interv Radiol 1996; 7: 313-20.
19. Rosenschein U, Bernstein JJ, DiSegni E, Kaplinsky E, Bernheim J, Rozenzsajn LA. Experimental ultrasonic angioplasty: disruption of atherosclerotic plaques and thrombi in vitro and arterial recanalization in vivo. J Am Coll Cardiol 1990; 15: 711-7.
20. Ariani M, Fishbein MC, Chae JS, et al. Dissolution of peripheral arterial thrombi by ultrasound. Circulation 1991; 84: 1680-8.
21. Behrens S, Spengos K, Daffertshofer M, Schroeck H, Dempfle CE, Hennerici M. Transcranial ultrasound-improved thrombolysis: diagnostic vs therapeutic ultrasound. Ultrasound Med Biol 2001; 27: 1683-9.
22. Suchkova V, Siddiqi FN, Carstensen EL, Dalecki D, Child S, Francis CW. Enhancement of fibrinolysis with 40-kHz ultrasound. Circulation 1998; 98: 1030-5.
23. Suchkova VN, Baggs RB, Francis CW. Effect of 40-kHz ultrasound on acute thrombotic ischemia in a rabbit femoral artery thrombosis model: enhancement of thrombolysis and improvement in capillary muscle perfusion. Circulation 2000; 101: 2296-301.
24. Suchkova V, Carstensen EL, Francis CW. Ultrasound enhancement of fibrinolysis at frequencies of 27 to 100 kHz. Ultrasound Med Biol 2002; 28: 377-82.
25. Birnbaum Y, Luo H, Nagai T, et al. Noninvasive in vivo clot dissolution without a thrombolytic drug: recanalization of thrombosed iliofemoral arteries by transcutaneous ultrasound combined with intravenous infusion of microbubbles. Circulation 1998; 97: 130-4.
26. Nedelmann M, Eicke BM, Lierke EG, Heimann A, Kempski O, Hopf HC. Low-frequency ultrasound induces nonenzymatic thrombolysis in vitro. J Ultrasound Med 2002; 21: 649-56.
27. Sakharov DV, Hekkenberg RT, Rijken DC. Acceleration of fibrinolysis by high-frequency ultrasound: the contribution of acoustic streaming and temperature rise. Thromb Res 2000; 100: 333-40.
28. Rosenschein U, Frimerman A, Laniado S, Miller HI. Study of the mechanism of ultrasound angioplasty from human thrombi and bovine aorta. Am J Cardiol 1994; 74: 1263-6.
29. Bamber JC. Attenuation and absorption. In: Hill CR, ed. Physical principles of medical ultrasonics. Chichester, England: Ellis Horwood, 1986: 118-99.
30. Hedrick WR, Hykes DL, Starchman DE. Ultrasound physics and instrumentation. 3rd edition. St Louis, MO: Mosby Publishing, 1995: 1-27.
31. Francis CW, Blinc A, Lee S, Cox C. Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. Ultrasound Med Biol 1995; 21: 419-24.
32. Rosenschein U, Roth A, Rassin T, Basan S, Laniado S, Miller HI. Analysis of coronary ultrasound thrombolysis endpoints in acute myocardial infarction (ACUTE trial). Results of the feasibility phase. Circulation 1997; 95: 1411-6.
33. Hamm CW, Steffen W, Terres W, et al. Intravascular therapeutic ultrasound thrombolysis in acute myocardial infarction. Am J Cardiol 1997; 80: 200-4.
34. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, et al. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 216.73.216.91 Sun, 06 Jul 2025, 22:08:34

study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. JAMA 1999; 282: 2003-11.
35. Clark WM, Wissman S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S. Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. JAMA 1999; 282: 2019-26.
36. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. N Engl J Med 1995; 333: 1581-7.
37. Del Zoppo GJ, Poeck K, Pessin MS, et al. Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. Ann Neurol 1992; 32: 78-86.
38. Von Kummer R, Hacke W. Safety and efficacy of intravenous tissue plasminogen activator and heparin in acute middle cerebral artery stroke. Stroke 1992; 23: 646-52.
39. Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA, et al. High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tPA infusion when continuously monitored with 2-MHz transcranial Doppler monitoring. Stroke 2000; 31: 610-4.
40. Porter TR, Everbach C, Kricsfeld D, Xie F. Myocardial cavitational activity during continuous infusion and bolus intravenous injections of perfluorocarbon-containing microbubbles. J Am Soc Echocardiogr 2001; 14: 618-25.
41. Porter TR, LeVeen RF, Fox R, Kricsfeld A, Xie F. Thrombolytic enhancement with perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin microbubbles. Am Heart J 1996; 132: 964-8.
42. Nishioka T, Luo H, Fishbein MC, et al. Dissolution of thrombotic arterial occlusion by high intensity, low frequency ultrasound and dodecafluoropentane emulsion: an in vitro and in vivo study. J Am Coll Cardiol 1997; 30: 561-8.
43. Mizushige K, Kondo I, Ohmori K, Hirao K, Matsuo H. Enhancement of ultrasound-accelerated thrombolysis by echo contrast agents: dependence on microbubble structure. Ultrasound Med Biol 1999; 25: 1431-7.
44. Dhond MR, Nguyen TT, Dolan C, Pulido G, Bommer WJ. Ultrasound-enhanced thrombolysis at 20 kHz with air-filled and perfluorocarbon-filled contrast bispheres. J Am Soc Echocardiogr 2000; 13: 1025-9.
45. Wu Y, Unger EC, McCreery TP, et al. Binding and lysing of blood clots using MRX-408. Invest Radiol 1998; 33: 880-5.
46. Schumann PA, Christiansen JP, Quigley RM, et al. Targeted-microbubble binding selectively to GPIIb IIIa receptors of platelet thrombi. Invest Radiol 2002; 37: 587-93.
47. Shohet RV, Chen S, Zhou YT, et al. Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. Circulation 2000; 101: 2554-6.
48. Weller GE, Villanueva FS, Klibanov AL, Wagner WR. Modulating targeted adhesion of an ultrasound contrast agent to dysfunctional endothelium. Ann Biomed Eng 2002; 30: 1012-9.
49. Price RJ, Kaul S. Contrast ultrasound targeted drug and gene delivery: an update on a new therapeutic modality. J Cardiovasc Pharmacol Ther 2002; 7: 171-80.
50. Riggs PN, Francis CW, Bartos SR, Penney DP. Ultrasound enhancement of rabbit femoral artery thrombolysis. Cardiovasc Surg 1997; 5: 201-7.