



Titolo: Fasi minerali fibrose e non in campioni biologici: determinazione mediante microscopia ottica ed elettronica

Autore: Randi, L.;^{1*} Libener, R.;² Croce, A.;³ Rinaudo, C.;³ Bertolotti, M.;⁴ Grosso, F.¹

Tipo: Articolo originale

Keywords: fibra; amianto; colecisti; bile;

Abstract

Background:La provincia di Alessandria e soprattutto l'area di Casale Monferrato sono note per l'elevata incidenza di tumori correlati all'amianto, in particolare il mesotelioma. Vi è l'impressione clinica, però, che anche l'incidenza dei tumori del tratto gastroenterico, tra cui i tumori della colecisti, sia più elevata della media nazionale in questa zona, ma non esiste un registro dedicato da cui si possano trarre dati conclusivi. La presenza delle fibre di amianto in campioni tissutali di soggetti con possibile esposizione ambientale e/o domestica ad amianto potrebbe suggerire un loro ruolo nella patogenesi delle malattie tumorali e fornire una valida motivazione per approfondire meglio in quest'area anche l'epidemiologia di altri tumori rari potenzialmente amianto correlati,

¹ S.C. Oncologia

Azienda Ospedaliera "SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria

² S.C. Anatomia Patologica

Azienda Ospedaliera "SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria

³ Gruppo di Ricerca di Mineralogia Ambientale

Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro" di Alessandria

⁴ S.S.A. Sviluppo e Promozione Scientifica

Azienda Ospedaliera "SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria

* Autore per la corrispondenza: lrandi@ospedale.al.it



mediante studi giustificati solo se effettivamente si dimostra la presenza di fibre di amianto negli organi di insorgenza.

Obiettivi: Questo studio si propone di applicare una metodologia di analisi messa a punto presso il Gruppo di Ricerca di Mineralogia Ambientale dell'Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro" per la localizzazione e l'identificazione di fasi mineralogiche ed eventuali fibre di amianto in campioni citologici ed istologici umani del tratto gastroenterico.

Metodi: Lo studio ha previsto un'analisi esplorativa per la presenza di fasi minerali asbestiformi in campioni istologici di colecisti umane provenienti da 5 pazienti (casi) residenti nell'area di Casale Monferrato, caratterizzati da una accertata esposizione ambientale all'amianto e operati per calcolosi biliare presso la S.C. di Chirurgia Generale ad Indirizzo Oncologico dell'A.S.O. "SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria, negli ultimi due anni. Per ciascun caso sono state osservate 3 repliche tissutali dallo spessore scelto di 5µm ciascuna. Inoltre, per il quarto caso è stato possibile effettuare l'analisi anche in un campione di liquido biliare. I campioni sono stati analizzati in modo anonimo e applicando le metodiche della microscopia ottica (MO) e della microscopia elettronica a scansione con annessa microsonda chimica (SEM/EDS) previste per la ricerca di fibre di amianto su campioni biologici.

Risultati: Dalle analisi delle sezioni istologiche in MO, purtroppo, lavorando a bassi ingrandimenti, non è stato possibile individuare fibre o corpuscoli ferruginosi. Le analisi in SEM/EDS condotte su sezioni e su liquido biliare hanno permesso invece di identificare numerose particelle micrometriche e submicrometriche con composizione riconducibile a quella degli amianti, insieme a particelle di composizione silicatica e metallica. E' stato inoltre possibile identificare fasi minerali fibrose corrispondenti a crocidolite, amosite, antofillite, crisotilo.

Conclusioni: Essendo questo studio un'analisi preliminare, il numero di campioni considerati è esiguo, ma si è potuto dimostrare la necessità di progettare sviluppi futuri più approfonditi. Sicuramente risulta necessario implementare il numero di campioni testati, eventualmente considerandone alcuni anche di origine epatica e gastrica, con annessa anamnesi clinica relativa alla effettiva esposizione all'amianto, per poter avere evidenza scientifica del ruolo degli amianti nella patogenesi di malattie del tratto gastroenterico.



1. Scopo del lavoro

1.1 Obiettivo dello studio

Questo studio si propone di applicare una metodologia di analisi messa a punto presso il Gruppo di Ricerca di Mineralogia Ambientale dell'Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro" per la localizzazione e l'identificazione di fasi mineralogiche ed eventuali fibre di amianto in campioni citologici ed istologici. In particolare, si prevede l'applicazione di tecniche di analisi in microscopia ottica (MO) ed elettronica a scansione (SEM), al fine di caratterizzare la presenza delle fibre di amianto su campioni tissutali del tratto gastroenterico di soggetti residenti nell'area di Casale Monferrato.

1.2 Back-ground

L'esposizione all'amianto rappresenta un importante fattore di rischio per l'insorgenza di mesoteliomi pleurici e peritoneali. E' possibile che possa esistere anche l'associazione con i carcinomi del tratto gastrointestinale e delle vie biliari, tra cui il colangiocarcinoma (CC).

Il colangiocarcinoma è una neoplasia rara (3% dei tumori del tratto gastrointestinale); l'eziologia è quasi sempre ignota e solo nel 10% circa dei casi l'insorgenza della neoplasia è preceduta da stati infiammatori cronici dei dotti biliari, quali colangite sclerosante primitiva, anomalie anatomiche delle vie biliari, infezioni epatiche e litiasi biliare. Meno chiaro è il ruolo di alcune sostanze tossiche fra cui l'amianto.

Il meccanismo attraverso il quale le fibre di amianto esercitano l'azione cancerogena, infatti, non è perfettamente noto. Sembra che esse siano in grado di provocare uno stato di infiammazione cronica, mantenuto e amplificato dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno, citochine, fattori di crescita e fattori pro-infiammatori, responsabili di alterazioni a carico sia dei meccanismi di difesa antiossidanti sia di quelli che controllano la proliferazione in cellule target (Brandi et al., 2013).

Contrariamente a quanto osservato per il mesotelioma pleurico maligno, l'associazione fra l'esposizione all'amianto e lo sviluppo di neoplasie del tratto gastrointestinale e delle vie biliari non è ancora stata dimostrata. Nel 1964 Selikoff et al., (Manning et al., 2002) hanno riscontrato un aumento del rischio di cancro dello stomaco, del colon e del retto in 632 lavoratori addetti alla produzione di materiali isolanti, esposti all'amianto per 20 anni o più,

confermato in revisioni successive della stessa casistica. I sostenitori di questa associazione affermano che l'aumento del rischio potrebbe essere dovuto alla deglutizione di fibre catturate dai meccanismi di clearance delle vie respiratorie, in grado, una volta giunte nel tratto gastroenterico, di indurre una risposta locale, superare la mucosa ed iniziare il processo di trasformazione neoplastica (Ehrlich et al., 1991).

Brandi et al (Brandi et al., 2008) hanno ipotizzato, anch'essi, una associazione tra esposizione ad amianto e neoplasia delle vie biliari mediante un'analisi di una coorte di pazienti affetti da CC con anamnesi positiva per esposizione ad amianto. Essi hanno sottolineato che è importante il periodo di latenza per lo sviluppo delle neoplasie biliari e la potenzialità cancerogena delle fibre ingerite. Lo sviluppo di tumori delle vie biliari, o comunque in sede diversa da quella pleuro-polmonare, potrebbe verosimilmente richiedere un tempo di latenza superiore rispetto a questi ultimi. Ciò sembrerebbe avvalorato anche dal fatto che la traslocazione di fibre è un processo lento che si sviluppa nell'arco di decenni, grazie alla elevata biopersistenza dell'asbesto (Miserocchi et al., 2008). L'altro aspetto riguarda l'esposizione per ingestione alle fibre di amianto, che in tale studio, sembrerebbe essere cancerogena per il tratto gastrointestinale e difficile da prevenire (Brandi et al., 2013).

1.3 Motivazioni dello studio

La provincia di Alessandria e soprattutto l'area di Casale Monferrato sono note per l'elevata incidenza di tumori correlati all'amianto, in particolare il mesotelioma. Vi è l'impressione clinica che anche l'incidenza dei tumori del tratto gastroenterico, tra cui i tumori della colecisti, sia più elevata della media nazionale in questa zona, ma non esiste un registro dedicato da cui si possano trarre dati conclusivi. La presenza delle fibre di amianto in campioni tissutali di soggetti con possibile esposizione ambientale e/o domestica ad amianto potrebbe suggerire un loro ruolo nella patogenesi delle malattie tumorali e fornire una motivazione per approfondire meglio in quest' area anche l'epidemiologia di altri tumori rari potenzialmente amianto correlati. Tra questi in particolare il colangiocarcinoma. I dati ad oggi a disposizione risultano infatti largamente insufficienti. Trattandosi di un tumore molto raro, le coorti di lavoratori analizzate rappresentano un campione troppo esiguo per giungere a considerazioni conclusive e non vi è chiarezza circa i tempi di osservazione necessari, perciò sarebbero opportuni ulteriori studi sperimentali su modelli animali e sull'uomo, che sono giustificati solo se effettivamente si dimostra la presenza di fibre di amianto negli organi di insorgenza.



2. Materiali e metodi

2.1 Tipologia dei campioni analizzati

Questo studio "pilota" è stato condotto su un gruppo di pazienti residenti nell'area di Casale Monferrato, caratterizzati da una accertata esposizione ambientale all'amianto e operati presso la Struttura Complessa (S.C.) di Chirurgia Generale ad Indirizzo Oncologico dell'A.S.O. "SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria, negli ultimi due anni.

Lo studio ha previsto un'analisi esplorativa per la presenza di fasi minerali asbestiformi in campioni istologici di colecisti umane provenienti da 5 pazienti operati per calcolosi biliare. Tali campioni sono stati conservati e messi a disposizione dalla S.C. di Anatomia Patologica della stessa Azienda Ospedaliera.

Per ciascun caso sono state osservate 3 repliche tissutali dallo spessore scelto di 5µm ciascuna: 1 sezione su vetrino da laboratorio classico e 2 sezioni su supporti di plastica, per un numero complessivo di 15 sezioni istologiche in tutto. Inoltre, per il quarto caso è stato possibile effettuare l'analisi di fasi minerali sia nel campione di colecisti che in un campione di liquido biliare proveniente dallo stesso paziente.

I campioni sono stati analizzati in modo anonimo e secondo le tecniche di identificazione, caratterizzazione di fibre minerali asbestiformi e di altre fibre inorganiche, in particolare quelle definite dalla normativa "Amianto". Sono state applicate le metodiche della microscopia ottica (MO) e della microscopia elettronica a scansione (SEM) previste per la ricerca di fibre di amianto su campioni biologici.

2.2 Preparazione dei campioni tissutali di colecisti

Le sezioni istologiche di colecisti sono state ricavate da blocchetto tissutale conservato in paraffina e deposte su vetrini da laboratorio. Per ciascun campione sono state preparate tre repliche: una su vetrino classico e due su supporto di plastica (per evitare l'interferenza della composizione chimica del vetro, composto principalmente da silicio e da magnesio, calcio e sodio, con le analisi in microscopia elettronica a scansione).

Per l'analisi in microscopia ottica i campioni non hanno richiesto ulteriori fasi di preparazione, mentre per l'analisi in microscopia elettronica a scansione dei campioni adesi sui supporti di plastica, è stato necessario effettuare il processo di sparaffinatura delle sezioni



mediante incubazione delle stesse in stufa a 75° C overnight. Al termine di questa fase i campioni erano pronti per essere sistemati su apposito pin-stub nel microscopio elettronico a scansione e per procedere con le analisi.

2.3 Preparazione del campione di liquido biliare

E' stato raccolto, inoltre, un campione di bile "fresca" proveniente da una colecisti analizzata. La bile è stata raccolta durante un intervento di chirurgia mininvasiva ed è stata stoccata in frigorifero a +4° C. Sono state preparate diverse aliquote del campione originario che sono state trattate con reagenti specifici, al fine di diluirne la quantità.

Dalle prime analisi effettuate sul liquido biliare "tal quale", infatti il campione è risultato molto concentrato, rendendo impossibile la localizzazione di eventuali fibre e/o particelle, pertanto sono state effettuate alcune prove di diluizione stoccando il campione in diverse aliquote trattate rispettivamente con acqua deionizzata (Milli-Q), etanolo e dimetilsolfossido (DMSO), al fine di scegliere per le analisi successive la soluzione che avrebbe dato risultati migliori in termini di riduzione di cristalli di ossalati e di calcoli presenti nel liquido biliare processato. Il DMSO viene utilizzato in analisi biochimiche per la conservazione delle colture cellulari a basse temperature, in quanto impedisce la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari e conseguentemente l'eventuale rottura cellulare.

Per ciascuna aliquota ottenuta sono stati prodotti 1 vetrino e 1 supporto di plastica deponendo su ognuno 20 µl di soluzione, lasciandola evaporare in essiccatori a temperatura ambiente overnight.

Questi campioni hanno mostrato ancora una notevole presenza di cristalli che impedivano la localizzazione di fibre sia in MO che in SEM, pertanto è stata applicata la metodologia di digestione chimica e filtrazione (Belluso et al., 2006) sia al campione di liquido biliare "tal quale" (aliquota 2) che al campione diluito con DMSO (aliquota 2A), entrambi conservati a 4° C, al fine di verificare una diminuzione di fasi cristallizzate.

La metodica applicata prevede l'aggiunta sia al campione di bile "tal quale" sia a quello diluito con DMSO, in specifiche quantità proporzionali ad esso, di acido solforico (quantità doppia rispetto al campione da digerire) ed acido nitrico (1/5 rispetto alla quantità di acido solforico aggiunta).

Le due soluzioni ottenute sono state lasciate a riposo overnight, sotto cappa, a temperatura ambiente, in crogiolo di porcellana ed il giorno successivo sono state entrambe filtrate, mediante pompa Venturi, su appositi filtri composti da membrane di esteri di cellulosa mista



(Millipore, Italia) con un diametro di 25 mm (stessa dimensione del pin-stub del SEM) e con una dimensione dei pori di 0,45 μm .

Durante la fase di filtrazione, è stato necessario diluire ulteriormente entrambe le soluzioni con acqua distillata calda per accelerare la dissoluzione dei cristalli micrometrici di NaCl, formatasi durante la digestione chimica. Infatti, il NaCl precipitato sulla membrana può sia nascondere le particelle inorganiche, che essere incluso nel volume analizzato, interferendo con le analisi chimiche (Belluso et al., 2006).

Per procedere con le osservazioni in microscopia sono state deposte piccole quantità di fluido biliare (circa 20 μl) su vetrino di plastica, lasciandole evaporare in essiccatori a temperatura ambiente overnight.

Per effettuare l'osservazione e la mappatura delle fibre e delle particelle minerali presenti nelle sezioni sottili e nei campioni di fluido biliare considerati in questo studio è stato adottato un Microscopio Ottico che permette di effettuare un'osservazione preliminare a diversi ingrandimenti (5x, 10x, 40x) dei minerali e del tessuto biologico al loro intorno.

Inoltre per caratterizzare le fibre e le particelle minerali è stata utilizzata la tecnica del Microscopio Elettronico a Scansione con annessa microsonda in dispersione di energia dei raggi X SEM/EDS che permette di determinare la composizione chimica delle fibre/particelle analizzate.

3. Risultati

3.1 Caratterizzazione morfologica e chimica di fibre e particelle inorganiche in campioni di colecisti umane

Dall'analisi in microscopia ottica delle sezioni istologiche di colecisti raramente è stato possibile identificare fibre e non sono state definibili ad ingrandimenti 10x e 40x particelle o corpuscoli nel tessuto; pertanto si è solo potuto acquisire immagini a bassi ingrandimenti per ottenere una visione d'insieme della sezione tissutale e della sua disposizione.

E' stato quindi necessario procedere con analisi accurate in microscopia elettronica a scansione, operando ad ingrandimenti maggiori. Queste analisi hanno dato risultati interessanti su quattro casi di sezioni istologiche, mentre il quinto ha presentato solo alcune particelle ascrivibili a residui calcifici.

Di seguito vengono descritti alcuni reperti che sono stati selezionati tra i più significativi dei campioni analizzati.

Caso n° 1

L'analisi al microscopio ottico ha rilevato alcune particelle di colore arancione-marroncino disperse nel tessuto e altre fasi corpuscolate di forma allungata, alcune però dovute a probabili impurezze.

Mediante microanalisi chimica in microscopia elettronica a scansione, invece, sono stati identificati, mediante analisi puntuali (IN), numerosi corpuscoli e particelle inorganiche.

Inoltre è stata eseguita una analisi puntuale nell'intorno della fibra, al di fuori di essa (OUT), la cui composizione dimostra la presenza pressoché unica di carbonio, quale elemento fondamentale della composizione del portacampioni, su cui è adesa la sezione.

I valori ottenuti dalle analisi OUT vengono acquisiti per ogni analisi su fasi fibrose e particellari su sezione e vengono sottratti alle analisi IN per ottenere la composizione ionica effettiva della fase analizzata.

I valori acquisiti evidenziano una composizione chimica qualitativa comprendente silicio, sodio, alluminio, che riconducono probabilmente alla composizione di una *zeolite erionite*, oppure in base alla conformazione morfologica si può ipotizzare che si tratti di una fibra vetrosa artificiale.

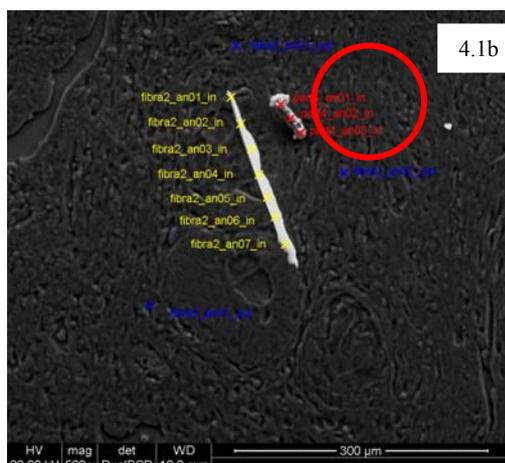


Fig. 4.1b: Osservazione al SEM della fibra 2 con rilevatore di elettroni retrodiffusi (BSD) a 500x. Il cerchio indica la particella 4.

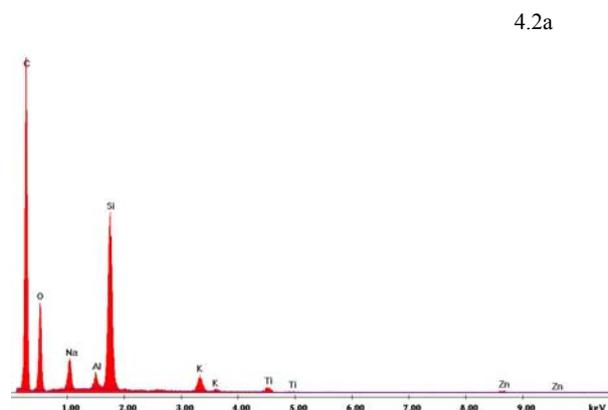


Figura 4.2a: Esempio di spettro EDS ottenuto dall'analisi chimica sulla fibra 2: le analisi IN dimostrano che la composizione chimica è ascrivibile a quella tipica di una erionite.

Caso n° 2

Dall'analisi al SEM sono stati identificati alcuni corpuscoli a composizione prevalente di sodio, zolfo, fosforo e cloro ed una sola fibra (di dimensioni $9,57\mu\text{m} \times 2,00\mu\text{m}$) su cui sono state eseguite analisi chimiche in più punti.

Di seguito sono riportate le immagini SEM (figure 4.6a; 4.6b; 4.6c; 4.6d; 4.6e; 4.6f).

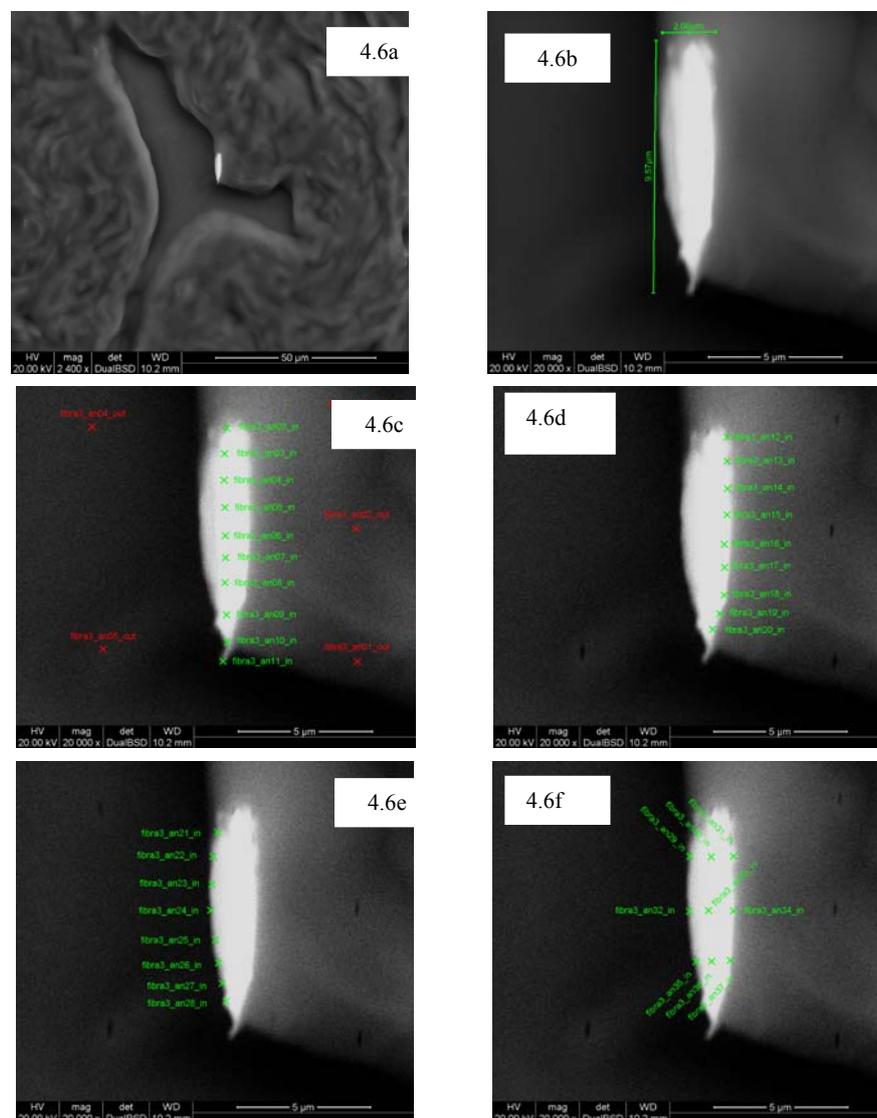


Figure 4.6 (a-f): osservazione al SEM della fibra 3 con rivelatore di elettroni BSD a 2400x e 20000x.

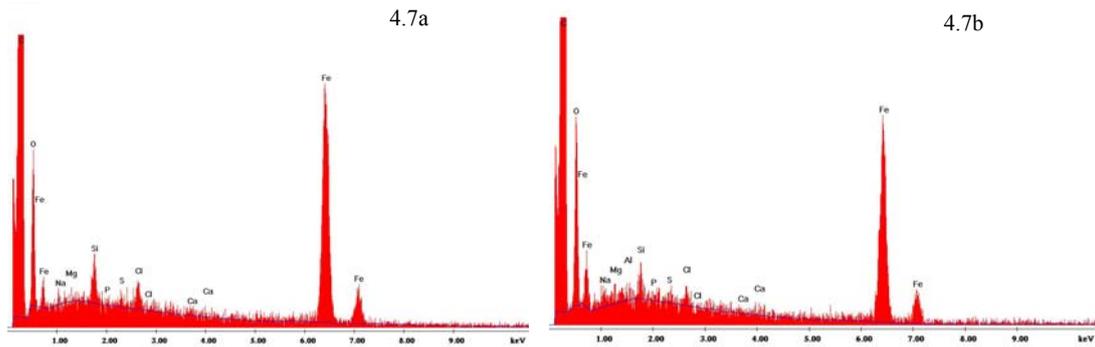


Figure 4.7 (a-b): Esempi di spettri EDS ottenuti dall'analisi chimica sulla fibra 3: due analisi IN lungo il transetto centrale della fibra indicano che potrebbe trattarsi di un silicato con presenza di ferro e sodio (riconducibile alla crocidolite).

Caso n° 3

Mediante analisi SEM sono state osservate alcune particelle che dall'analisi chimica hanno mostrato un composizione prevalente di ioni ferro, silicio, alluminio, magnesio e calcio; altre invece presentavano anche zolfo.

Tra queste, una particella (di dimensioni $4,20\mu\text{m} \times 1,84\mu\text{m}$) dimostra una composizione atomica ricca di silicio, magnesio, ferro e calcio, perciò ascrivibile alla tipica composizione della *actinolite*, ma non possiede le dimensioni caratteristiche di una fibra respirabile; è definibile quindi solo cristallo allungato.

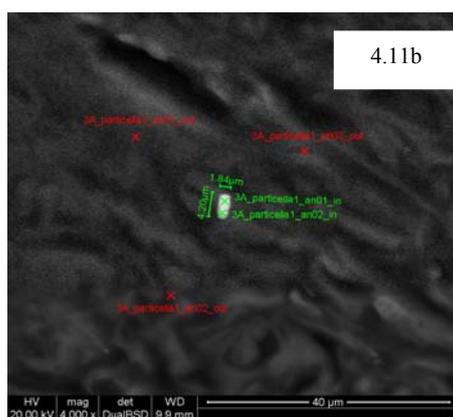


Figura 4.11 b: osservazione al SEM della particella 1 con rivelatore di elettroni retrodiffusi (BSD) a 4000x.

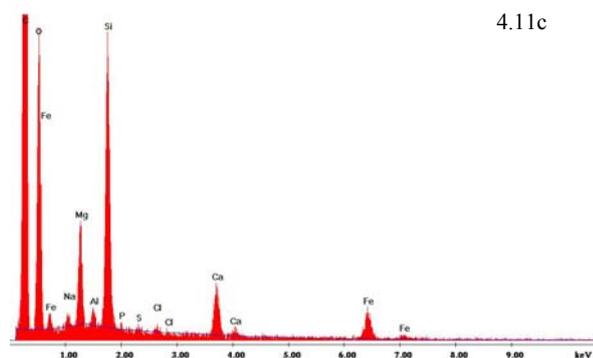


Figura 4.11 c: Esempi di spettri EDS ottenuti dall'analisi chimica sulla particella 1: due analisi IN dimostrano che si potrebbe trattare di una actinolite (fibra non respirabile).

caso	% atomica										
	C	O	Si	Al	Mg	Fe	Na	Ca	S	P	Cl
part01_an01_in	84,0	12,9	1,4	0,0	0,6	0,3	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0
part01_an02_in	82,3	12,1	1,1	0,1	0,5	0,3	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0
part01_an01_o	97,0	2,84	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
part01_an02_o	97,9	1,96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
part01_an03_o	95,9	3,96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
media in	83,2	12,5	1,2	0,1	0,5	0,3	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0
media out	96,9	2,92	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
media in -	-	9,62	1,2	0,1	0,5	0,3	0,0	0,2	-	0,0	0,0

Tabella 4.7: composizione quantitativa con percentuali atomiche relative a ciascun punto di analisi sulla particella 1.

E' stata poi identificata una fase allungata che presenta quantità predominanti di ferro, silicio e magnesio, tipiche della composizione della *amosite* (ferro > magnesio) o della *antofillite* (ferro < magnesio): per distinguere se si tratta di una o dell'altra fase minerale, sarebbe stato necessario eseguire analisi puntuali lungo un transetto orizzontale per verificare, mediante sottrazione dei valori di ferro presente nei punti laterali, ai valori di ferro centrali e di qui ottenere la netta composizione di ferro della fibra. Ciò però non è stato possibile poiché questo cristallo presentava dimensioni troppo piccole per eseguire analisi lungo un transetto orizzontale.

Inoltre sono state osservate alcune particelle che probabilmente si trovavano sopra alla sezione analizzata e non presentavano una composizione chimica uniforme, alcune mostravano più ferro, altre silicio, altre alluminio, calcio, zinco.

Caso n° 4

Analizzando questo campione in microscopia SEM sono state identificate numerose particelle aventi composizione chimica varia, alcune prevalentemente di ferro, alcune prevalentemente di silicio (particella 1), altre di silicio e ferro (particella 3), altre ancora di calcio (particella 5 e 7).

Di seguito sono presentate le osservazioni morfologiche e le analisi chimiche di alcune di queste particelle, le più esemplificative.

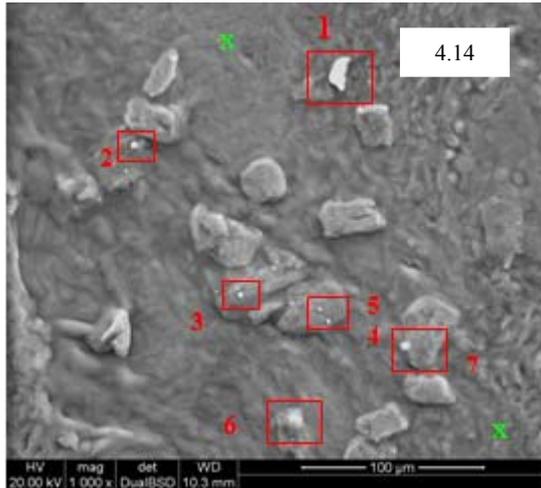
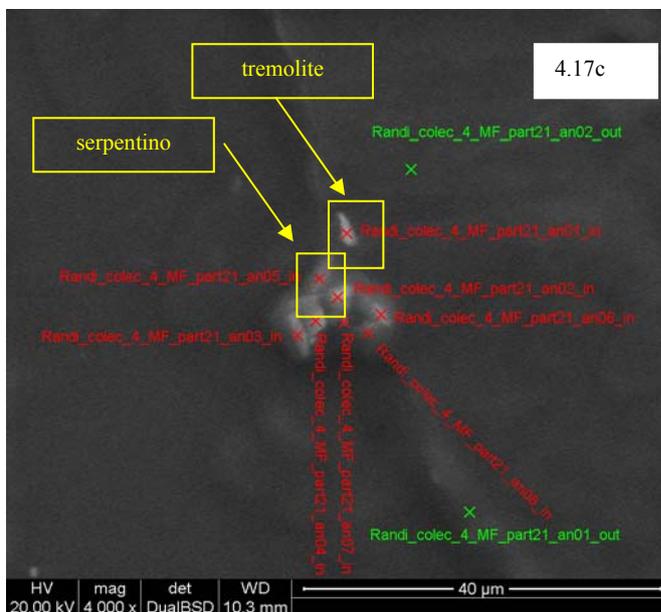


Fig. 4.14: particelle 1_2_3_4_5_6_7 osservate con rivelatore a elettroni retrodiffusi (BSD).

Le analisi chimiche hanno mostrato una composizione esclusivamente di *silicio* della particella 1, di *calcio* per la particella 5, dell'*albite* (silicio, alluminio e sodio) per la particella 6 e di un *talco* (silicio e magnesio, il secondo in quantità lievemente minore del primo) per la particella 8.



Dagli spettri EDS, tra le varie particelle metalliche osservate, si possono identificare una particella con composizione chimica riconducibile a tremolite (particella 21_an01), una al serpentine (particella 21_an05), rimane comunque difficile la caratterizzazione di ciascuna poiché tutte sono talmente vicine tra loro che risentono molto della composizione chimica reciproca.

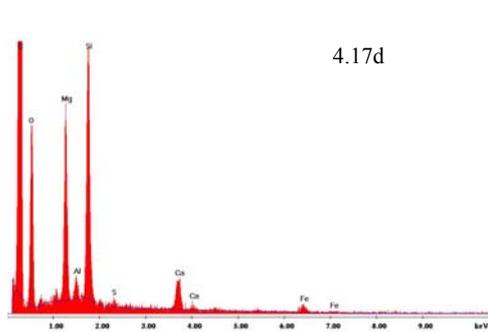


Figura 4.17d: analisi EDS di una particella contenente silicio, magnesio, alluminio, calcio e ferro, che fa ricondurre alla composizione della tremolite di amianto.

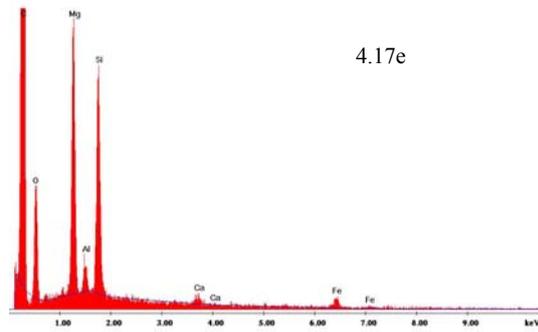


Figura 4.17e: analisi EDS di una particella contenente magnesio, silicio, alluminio, ferro e calcio, che fa ricondurre alla composizione del serpentino.

Caso	% atomica								
	C	O	Si	Al	Mg	Fe	Na	Ca	S
part21_an01_in	88,63	8,41	1,30	0,11	1,17	0,11	0,00	0,22	0,04
part21_an02_in	89,85	6,2	0,34	0,08	0,26	0,00	0,00	3,27	0,00
part21_an03_in	89,44	6,01	2,76	0,08	1,56	0,16	0,00	0,00	0,00
part21_an04_in	85,79	9,21	4,38	0,12	0,26	0,00	0,00	0,24	0,00
part21_an05_in	92,01	5,05	1,04	0,15	1,57	0,13	0,00	0,06	0,00
part21_an06_in	89,07	9,47	0,50	0,14	0,58	0,09	0,00	0,12	0,02
part21_an07_in	89,39	6,66	1,33	0,43	0,83	0,4	0,13	0,83	0,00
part21_an08_in	94,41	2,26	1,33	0,15	1,60	0,19	0,00	0,00	0,00
part21_an01_out	98,18	1,82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
part21_an02_out	97,69	2,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
media out	97,93	2,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabella 4.11: composizione quantitativa con percentuali atomiche relative a ciascun punto di analisi sull'accumulo di particelle 21. Le analisi OUT (in verde) evidenziano solo carbonio e ossigeno.

Osservando al SEM la seconda replica del caso n° 4 (sezione 4b) sono state identificate due ulteriori fibre di cui una mostra l'aspetto e la composizione tipici delle fibre silicatiche artificiali.

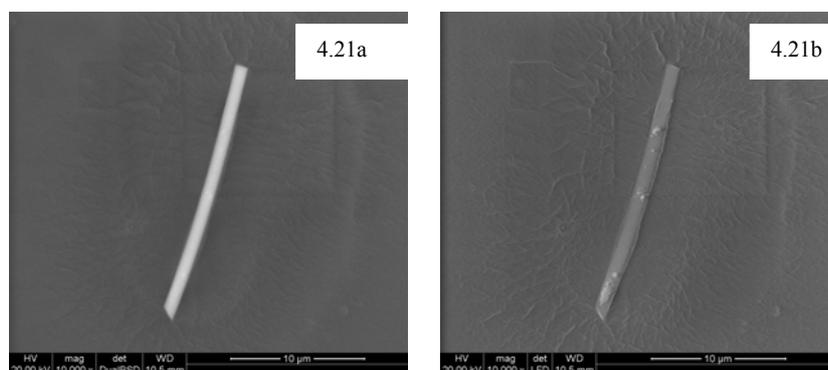


Figure 4.21 (a-b): osservazione al SEM con rivelatore di elettroni retrodiffusi (BSD) e secondari (LFD) della fibra 01 di natura probabilmente artificiale.

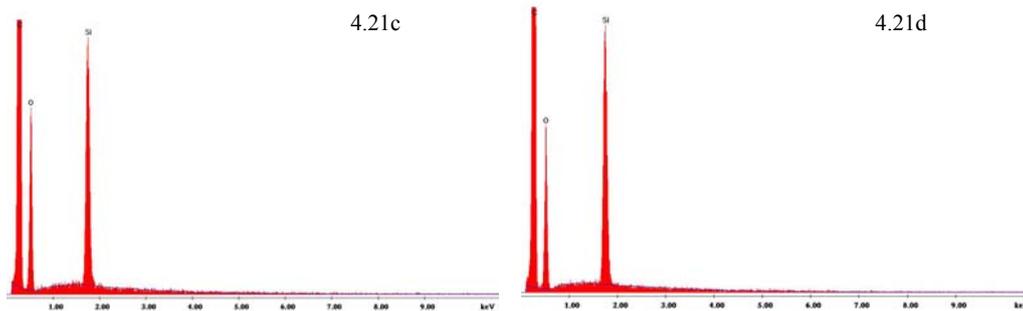


Figure 4.21 (c-d): Esempi di spettri EDS relativi a punti di analisi interni alla fibra 01 riportata in Fig. 4.21b

caso 4b fibra01	% atomica		
	C	O	Si
fibra01 an01 in	88,75	9,80	1,45
fibra01 an02 in	89,64	8,79	1,56
fibra01 an03 in	89,09	9,21	1,71
fibra01 an01 out	98,38	1,62	0,00
media in	89,16	9,27	1,57
media out	98,38	1,62	0,00
media in - media	-9,22	7,65	1,57

Tabella 4.15: composizione atomica relativa alle analisi eseguite sulla fibra 01: si può notare la composizione predominante del silicio.

L'analisi EDS ha permesso di identificare come componente della fibra esaminata il silicio.

Caratterizzazione morfologica e chimica di fibre e particelle inorganiche in un campione di liquido biliare derivante dalla colecisti del caso n° 4.

Dopo aver analizzato le sezioni di colecisti del caso n° 4, è stato processato anche un campione di fluido biliare dello stesso paziente, per la ricerca di eventuali fibre o particelle inorganiche. Inizialmente sono state effettuate analisi in microscopia ottica ed in microscopia elettronica a scansione sul campione di liquido biliare tal quale e su un'aliquota diluita con, ma poiché la presenza persistente di cristalli impediva l'identificazione e quindi l'analisi di eventuali fibre presenti, si è deciso di applicare le stesse analisi sulle aliquote di fluido biliare sia tal quale che diluito con DMSO, dopo averli sottoposti a un processo di digestione chimica e ne sono stati confrontati i risultati.

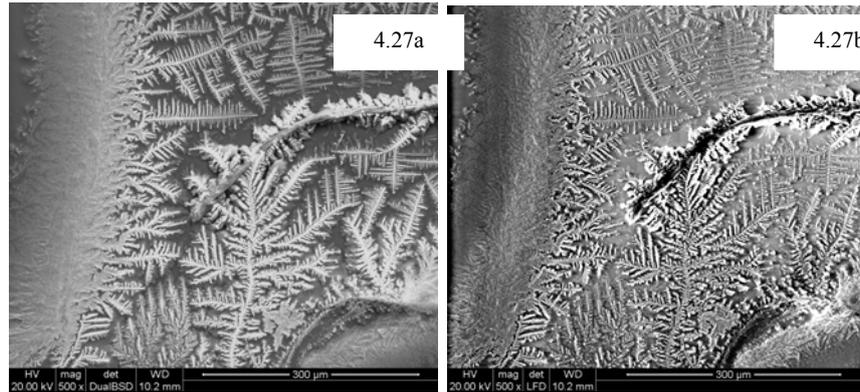


Figure 4.27 (a-b): panoramica del campione di fluido biliare tal quale, osservato al SEM con rivelatore di elettroni retrodiffusi (BSD) e secondari (LFD) a 500x.

Di seguito si può osservare un'immagine relativa all'osservazione del campione di liquido biliare diluito con DMSO, osservato al MO e successivamente processato al SEM con gli spettri ottenuti raffiguranti le analisi chimiche effettuate sulle particelle identificate.

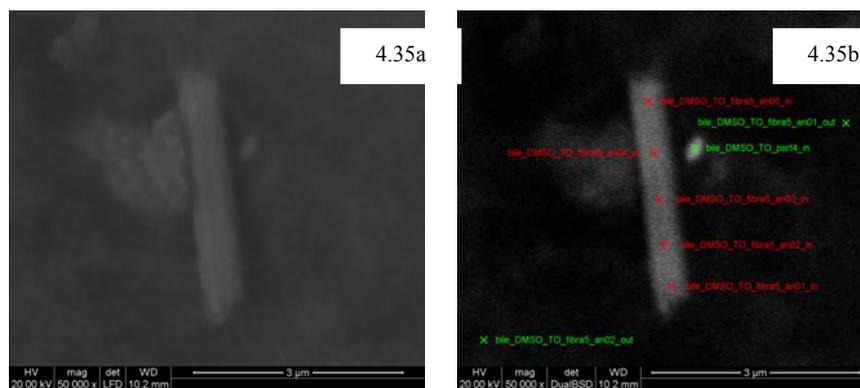


Figure 4.35 (a-b): osservazione al SEM della fibra 5 con rivelatore di elettroni secondari (LFD) e retrodiffusi (BSD) a 50000x.

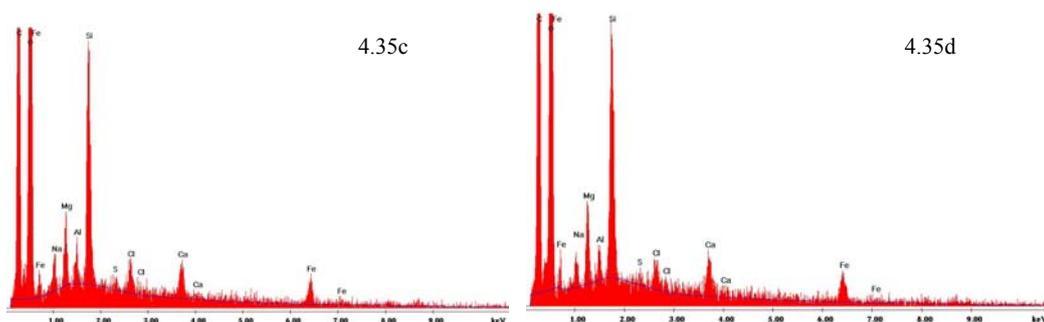


Figure 4.35 (c-d): Esempi di spettri EDS ottenuti dall'analisi chimica sulla fibra 5: due analisi dimostrano che la composizione chimica predominante è quella tipica della actinolite (rapporto lunghezza/diametro 4:1).

In base alle composizioni atomiche rilevati nei punti di analisi sulla fibra 5 è possibile dedurre che, data la percentuale di presenza di silicio, magnesio in rapporto maggiore rispetto al ferro e alle sue dimensioni caratteristiche di una fibra respirabile, si potrebbe trattare di una fibra di *actinolite*. Il Na presente, invece, potrebbe combinarsi con il Cl e formare un rivestimento di cloruro di sodio sulla fibra.

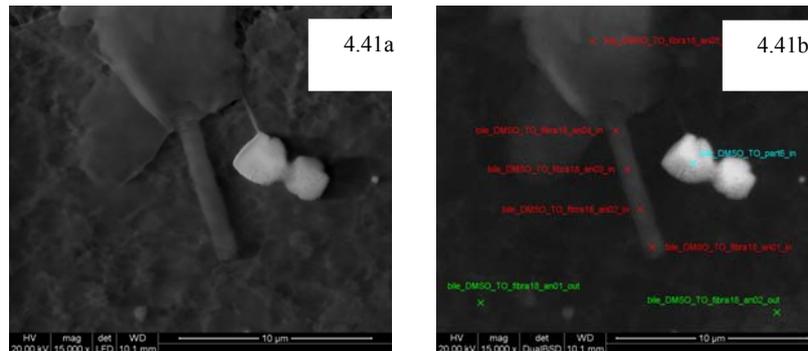


Figure 4.41 (a-b): osservazione al SEM del cristallo 18 con rivelatore di elettroni secondari (LFD) e retrodiffusi (BSD) a 15000x.

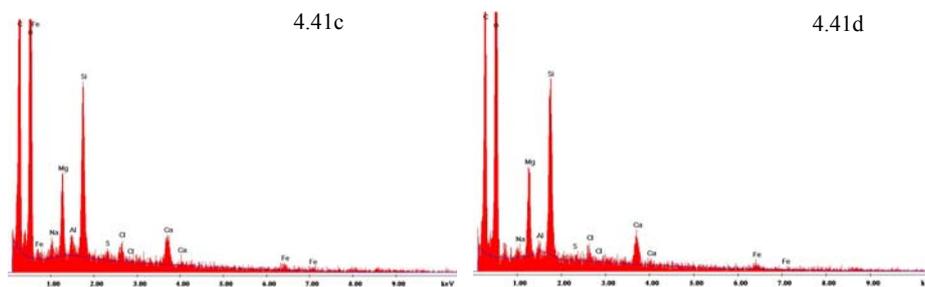


Figure 4.41 (c-d): Esempi di spettri EDS ottenuti dall'analisi chimica sul cristallo 18: due analisi IN dimostrano che la composizione chimica è quella tipica di una tremolite.

bile+DMSO	% atomica									
	C	O	Si	Al	Mg	Fe	Na	Cl	S	Ca
crist18 an01 in	59,25	35,60	2,17	0,25	1,39	0,2	0,35	0,21	0,12	0,47
crist18 an02 in	56,59	37,82	2,45	0,13	1,80	0,21	0,22	0,19	0,06	0,52
crist18 an03 in	57,63	36,28	2,71	0,23	1,82	0,19	0,24	0,20	0,10	0,6
crist18 an04 in	57,45	36,99	2,47	0,15	1,68	0,20	0,29	0,18	0,10	0,48
crist18 an05 in	54,37	39,42	3,22	0,00	2,69	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00
crist18 an06 in	54,37	38,09	3,59	0,14	3,32	0,12	0,25	0,11	0,00	0,00
crist18 an07 in	54,67	39,04	2,99	0,00	2,09	0,14	0,30	0,00	0,00	0,57
crist18 an01 out	65,99	33,14	0,30	0,14	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00
crist18 an02 out	62,17	35,96	0,71	0,27	0,00	0,00	0,60	0,29	0,00	0,00
crist18 an03 out	65,81	33,22	0,32	0,16	0,00	0,00	0,30	0,18	0,00	0,00
media in	56,33	37,61	2,80	0,13	2,11	0,15	0,28	0,13	0,05	0,38
media out	64,65	34,10	0,44	0,19	0,00	0,00	0,30	0,20	0,00	0,00
media in - media	-8,32	3,50	2,36	-	2,11	0,15	-	-	0,05	0,38

Tabella 4.32: composizione atomica del cristallo 18: si può vedere prevalenza di silicio, magnesio, calcio e ferro, tipica di una tremolite.



4. Risultati e Conclusioni

Dalle analisi delle sezioni istologiche effettuate in MO, purtroppo, lavorando a bassi ingrandimenti, non è stato possibile individuare fibre o corpuscoli ferruginosi, ma solo raramente si sono osservati accumuli di piccole particelle di colore marrone che potrebbero essere definiti accumuli di colesterolo, precursore dei calcoli biliari.

Dalle analisi in SEM dei campioni relativi a tutti i casi considerati in studio e dai dati riguardanti i risultati ottenuti in termini di composizione atomica di ciascuna fase minerale identificata, è stato possibile confermare la presenza di numerose fasi minerali inorganiche, sia nelle quattro sezioni istologiche, che nel liquido biliare relativo al caso n°4.

Sono state individuate alcune fasi allungate, ma che non potevano essere definite "amianti" per composizione chimica, infatti sono state osservate molte fibre silicatiche, ma che sia dall'aspetto morfologico e dalla modalità della rottura della fibra (lungo l'asse trasversale) potevano essere riconducibili solo a fibre artificiali. Altre fasi allungate, invece, hanno presentato la composizione tipica degli "amianti", ma per definizione dell'OMS riguardo le dimensioni, non potevano essere considerate fibre respirabili".

Durante le analisi SEM sia delle sezioni che del liquido biliare si sono identificate numerose particelle metalliche, alcune ossificazioni, altre ancora che per composizione richiamavano, per esempio, quella tipica del crisotilo, dell'actinolite e della tremolite, ma che per dimensioni non potevano essere considerate "fibre". Nelle sezioni tissutali sono state identificate, inoltre, alcune fasi mineralogiche fibrose: per esempio la crocidolite, l'amosite o antofillite, il crisotilo e alcuni altri anfiboli.

Interessante è stato il confronto tra ciò che è stato analizzato in sezione tissutale del caso n° 4 e il liquido biliare processato, poiché relativo allo stesso paziente. Nel liquido biliare diluito con DMSO si sono identificate alcune particelle inorganiche come le miche o la lizardite, presenti, peraltro, anche in sezione tissutale. Nel liquido biliare diluito con DMSO e digerito chimicamente sono state individuate sempre alcune particelle minerali, ma anche diverse fasi fibrose, che presentavano composizioni chimiche riconducibili alla muscovite, all'actinolite, all'antofillite ed alla tremolite.



Poiché questo studio è stato definito un'analisi preliminare, il numero di campioni considerati è stato piuttosto esiguo (in totale sono stati analizzati solo cinque casi più il liquido biliare) e poiché vi è ancora insufficienza di dati scientifici in letteratura riguardo sia la metodica sperimentale standardizzata, che la comprovata identificazione di fibre di amianto in questa tipologia di campioni biologici, avendo ottenuto comunque risultati significativi e soddisfacenti, si può pensare di sviluppare lo studio in futuro in modo più approfondito, sicuramente implementando il numero di campioni testati, eventualmente considerandone alcuni anche di origine epatica e gastrica, con annessi anamnesi clinica e relativa alla effettiva esposizione all'amianto, al fine di mettere a punto indagini scientifiche più solide e statisticamente rilevanti.



Bibliografia

- E. Belluso, materiale didattico del corso di "Determinazione di materiali asbestiformi nei rifiuti ed in altre matrici", master in "Analisi e gestione dei rischi da rifiuto contenente amianto per l'ambiente e la salute", 2012-2013.
- E. Belluso, D. Bellis, E. Fornero, S. Capella, G. Ferrari, S. Coverlizza, "Assessment of Inorganic Fibre Burden in Biological Samples by Scanning Electron Microscopy – Energy Dispersive Spectroscopy", *Microchim Acta*, (2006).
- G. Brandi, S. Di Girolamo, F. Belpoggio, G. Grazi, G. Ercolani, G. Biasco, "Asbestos exposure in patients affected by bile duct tumours". *Eur. J. Oncol.*, vol. 13, n. 3, pp. 171-179, 2008.
- G. Brandi, S. Di Girolamo, A. Farioli, F. de Rosa, S. Curti, A.D. Pinna, G. Ercolani, F. S. Violante, G. Biasco, S. Mattioli, "Asbestos: a hidden player behind the cholangiocarcinoma increase? Findings from a case-control analysis", *Cancer Causes Control* (2013) 24:911–918.
- A. Ehrlich, R.E. Gordon, S.H. Dickman, "Carcinoma of colon in asbestos-exposed workers: analysis of asbestos content in colon tissue meta-analysis". *Am J Ind Med* 1991; 19: 629-36.
- G. Miserochi, G. Sancini, F. Mantegazza, et al., "Translocation pathways for inhaled asbestos fibers". *Environ Health* 2008; 7: 4.
- C.B. Manning, V. Vallyathan, B.T. Mossman "Disease caused by asbestos: mechanism of injury and disease development". *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 191-200.