

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE “AMEDEO AVOGADRO”



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA
CURRICULUM NUTRIZIONE ED AMBIENTE

TESI DI LAUREA

PLACENTA E INQUINANTI AMBIENTALI: CONFRONTO TRA LE
DIVERSE TECNICHE DI MICROSCOPIA OTTICA, ELETTRONICA E
SPETTROSCOPIA A MICRO-RAMAN.

Candidato: Alice Cadamuro *Alice Cadamuro*

Docente Relatore: Dott. CROCE Alessandro *Alessandro Croce*

Co-Relatore: Dott.ssa BERTOLOTTI Marinella

Tutor estero: Dott.ssa BELLIS Donata

(Medico-chirurgo, spec. Anatomia Patologica)

Stage Svolto Presso: DAIRI
Laboratorio integrato ricerca amianti.
Presidio ospedaliero - Ospedale “S. Spirito”, di Casale Monferrato.

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

1.	SCOPO DEL LAVORO.....	4
2.	INTRODUZIONE.....	5
2.1	FISIOLOGIA PLACENTARE	6
2.1.1	STRUTTURA	6
2.1.2	PLACENTA PRIMITIVA	7
2.1.3	PLACENTA DEFINITIVA	9
2.1.4	CORDONE OMBELICALE	12
2.1.5	CIRCOLAZIONE PLACENTARE.....	12
2.1.6	FUNZIONI DELLA PLACENTA	14
2.2	ISTOLOGIA PLACENTARE	17
2.3	PATOLOGIE PLACENTARI.....	20
2.3.1	ABORTO SPONTANEO.....	20
2.3.2	GRAVIDANZA ECTOPICA.....	21
2.3.3	ANOMALIE DI IMPIANTO PLACENTARE	22
2.3.4	INFEZIONI PLACENTARI	24
2.3.5	PREECLAMPSIA E ECLAMPSIA	25
2.3.6	MALATTIA TROFOBLASTICA GESTAZIONALE	26
2.4	PATOLOGIE PLACENTARI DA INQUINAMENTO.....	28
2.5	LE MICROPLASTICHE.....	29
2.6	AMIANTO.....	32
2.7	METALLI PESANTI	34
3.	MATERIALI E METODI	35
3.1.	PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER MICROSCOPIA OTTICA	35
3.2	MICROSCOPIA OTTICA	38
3.2.1	FUNZIONAMENTO MICROSCOPIO OTTICO A LUCE TRASMESSA E POLARIZZATA ...	38
3.3	MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE.....	42
3.3.1	FUNZIONAMENTO DELLO STRUMENTO	44
3.4	SPETTROSCOPIA MICRO-RAMAN.....	49
4.	RISULTATI.....	54
4.1	ANALISI AL MICROSCOPIO OTTICO:	55
4.2	ANALISI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE.....	63
4.3	ANALISI IN SPETTROSCOPIA MICRO-RAMAN.....	69
5.	CONCLUSIONI.....	71
6.	BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	74
7.	RINGRAZIAMENTI	78

1. SCOPO DEL LAVORO

Durante il tirocinio svolto presso il Laboratorio integrato ricerca amianti del Dipartimento delle Attività Integrate Ricerca e Innovazione (DAIRI) nel presidio ospedaliero “S.Spirito” di Casale Monferrato, si è svolta una ricerca atta ad identificare una possibile correlazione fra inquinanti ambientali e lo sviluppo di patologie o malformazioni a livello del tessuto placentare umano. Nel dettaglio, il lavoro è stato necessario per evidenziare quali tecniche fossero di più veloce e pratica applicabilità su questa tipologia di campione.

La scelta dello studio sul tessuto placentare è stata presa in vista del fatto che sono sempre più frequenti patologie associate a malformazioni fetali, aborti, malformazioni placentari e patologie associate a malfunzionamenti placentari derivanti da esposizione a inquinanti.

Lo studio è stato possibile grazie alla collaborazione del personale medico, fra cui anatomo-patologi, mineralisti, biologi e dalla collaborazione di due centri universitari, UPO e Centro Scansetti dell’Università degli Studi di Torino (Centro universitario interdipartimentale). La collaborazione interdisciplinare tra diversi professionisti è fondamentale in quanto ogni figura ricopre un ruolo decisivo nella ricerca.

In questo studio, in particolare, si è preso in considerazione il tessuto placentare sia nel versante coriale che nel versante deciduale, per evidenziare la presenza di eventuali contaminanti fra cui microplastiche, metalli pesanti, ed anche la possibile presenza di fibre riconducibili all’amianto.

Durante lo svolgimento di questo studio si è cercato di dimostrare l’importanza dell’utilizzo di diverse tecniche, quali spettroscopia micro-Raman, microscopia ottica e microscopia elettronica a scansione con annessa microsonda in dispersione di energia (SEM/EDS) per evidenziare l’eventuale presenza di componenti estranee al tessuto in analisi.

La scelta dell’utilizzo di queste tecniche è stata fatta in vista della loro efficacia in precedenti lavori relativi a inquinanti e microplastiche.

Per questo studio, le tecniche utilizzate prevedono la preparazione del campione incluso in paraffina, successivo taglio delle sezioni al microtomo e colorazione delle stesse in ematossilina ed eosina.

Segue l’analisi di queste in microscopia ottica, poi in SEM/EDS e infine in spettroscopia a micro-Raman qualora ci fossero riscontri positivi per la presenza di eventuali inquinanti ricercati.

2. INTRODUZIONE

La durata della gravidanza umana è di circa 9 mesi, ed è un lungo periodo definito “sviluppo prenatale” che può essere suddiviso sia in trimestri (primo, secondo e terzo), sia in altri tre sottoperiodi, in base allo sviluppo dell’organismo:

- Sviluppo pre-embrionale. Dura circa le prime due settimane successive alla fecondazione ed è la fase fondamentale per la formazione del pre-embrione, il quale si deve impiantare nella parete uterina.
- Sviluppo embrionale. Segue la precedente fase, e decorre dalla terza all’ottava settimana.
- Sviluppo fetale. Inizia con la nona settimana e prosegue fino al momento del parto.

È proprio durante il primo trimestre che si forma la placenta, detto anche processo di placentazione, vale a dire la formazione della placenta ad opera dei tessuti embrionali e materni. Questo processo inizia con la comparsa dei primi vasi sanguigni nel corion. Segue poi la formazione dei villi coriali, fondamentali per la diffusione dei nutrienti e delle componenti respiratorie. In seguito, il corion continuerà ad ingrandirsi e ad espandersi nell’endometrio finché alla quarta settimana l’embrione si troverà in questa cavità in espansione, piena di liquido amniotico. Il collegamento tra embrione e corion è detto peduncolo di connessione.

La placenta invece, non seguirà ad ingrandirsi in modo indefinito, ma inizierà a sviluppare le diverse strutture funzionali al suo interno. Infatti la porzione funzionale di quest’organo deciduale, sarà concentrata in una zona a forma di disco situata nella parte profonda dell’endometrio. Verso il termine del primo trimestre, il feto tenderà ad allontanarsi dalla placenta, per rimanervi comunque collegato attraverso il cordone ombelicale (o funicolo ombelicale), il quale contiene i vasi sanguigni placentari per gli scambi materno- fetali.

Al termine del terzo trimestre, quando il feto ha raggiunto la maturità tale da consentirgli di nascere, iniziano il travaglio e il conseguente parto. Infatti, durante il travaglio c’è un notevole aumento dell’ossitocina, con conseguente sensibilizzazione dell’utero ad essa, che

comporta la comparsa di contrazioni del miometrio, le quali si propagano per tutto l'utero, necessarie alla mobilitazione del feto verso il canale cervicale per la buona riuscita del parto.

Quando il feto viene fatto nascere, il processo non termina immediatamente, infatti incorre ora il secondamento, durante il quale le contrazioni delle pareti muscolari uterine vuote interrompono i collegamenti tra endometrio e placenta, questo comporta il distacco placentare e la sua conseguente espulsione entro un'ora circa dal parto. Questo può comportare una perdita sanguigna da parte della madre, ma che, se avviene nelle fisiologiche condizioni, può essere sopportata senza conseguenze alcune. Il tutto è possibile grazie al fatto che durante la gestazione, il volume sanguigno materno è aumentato in vista del parto (Anatomia umana, Martini, Tallitsch, Nath, VII edizione 2019).

2.1 FISILOGIA PLACENTARE

2.1.1 STRUTTURA

La placenta è un organo deciduale, di forma discoidale, con complesse funzioni, le quali sono strettamente correlate con l'iniziale crescita embrionale e con la conseguente crescita fetale. Il tutto è possibile perché quest'organo consente il nutrimento, la respirazione, l'eliminazione di sostanze di rifiuto e, infine, la protezione del feto anche da eventuali patogeni, grazie all'azione immunitaria che svolge.

Inoltre, è fondamentale ricordare l'azione svolta anche nei confronti della donna, poiché è l'organo deputato alla produzione di diversi ormoni che consentiranno l'avanzare della gestazione.

La sua struttura è costituita da due componenti principali:

- Versante embrio-fetale, che deriva dal corion frondosum;
- Versante materno, che deriva dalla decidua basale.

La porzione materna, definita appunto decidua basale, presenta dei rigonfiamenti detti cotiledoni materni. Sulla porzione fetale invece, è delimitata da una lamina connettivale denominata placca corionica, ed è il punto di inserzione del cordone ombelicale, da cui si ripartiscono lungo l'intero organo le arterie e le vene ombelicali.

Sia la superficie fetale che il cordone ombelicale sono rivestiti dall'amnios.

Tra la decidua basale e la placca corionica, invece, sono presenti degli spazi definiti spazi intervillosi, nei quali si trova il sangue materno. Questa separazione del sangue fetale da quello materno è consentita da un tessuto derivante dal corion, motivo per il quale la placenta è detta emocoriale.

Durante il decorso della gestazione, la placenta si divide in due organizzazioni: la placenta primitiva e la placenta definitiva (Embriologia umana, M. De Felici, 2020).

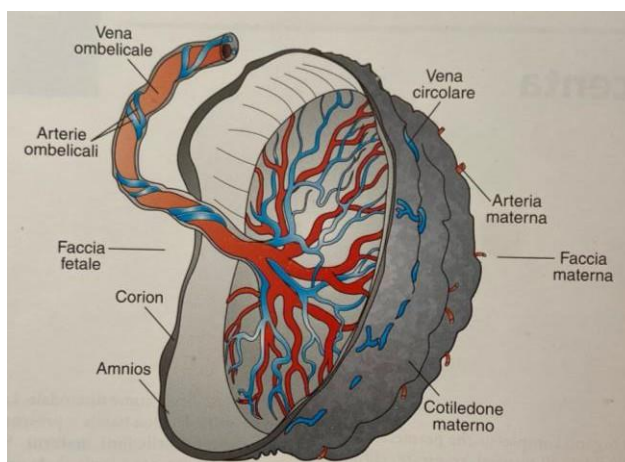


Fig.1 Disegno schematico di placenta al termine della gestazione. (Embriologia umana, M. De Felici, 2020).

2.1.2 PLACENTA PRIMITIVA

La placenta primitiva ha struttura sferica e circonda totalmente il corion. Essa inizia a generarsi nella seconda settimana di sviluppo, durante l'impianto, nel momento in cui la decidua avvolge la blastocisti e il sangue materno defluisce negli spazi del sinciziotrofoblasto verso il versante esterno del corion. Tutto questo consente la nutrizione istotrofica della blastocisti, ma dopo qualche giorno, grazie alla crescita, l'embrione si allontana dal sincizio e la nutrizione istotrofica viene rimpiazzata dalla nutrizione emotrofica, grazie alla creazione dell'apparato circolatorio primitivo.

L'apparato circolatorio primitivo si genera velocemente, a partire dalla fine della terza settimana di sviluppo. Per entrare in funzione, però, è necessario che la distanza fra sangue materno ed embrionale sia minima, e questo è reso possibile dalla formazione dei villi coriali

e degli spazi intervillosi. Tutti questi eventi conferiscono alla placenta primitiva la tipica costruzione a cespuglio.

La comparsa dei villi coriali avviene nella seconda settimana, ed appaiono come delle protuberanze del citotrofoblasto. Dal tredicesimo giorno, poi, essi si prolungano generando i villi primari: ovvero veri e propri cordoni costituiti internamente da citotrofoblasto, ed esternamente da sinciziotrofoblasto.

Dal quindicesimo giorno i villi primari continuano a crescere e ramificare, invece diverse cellule del mesenchima provenienti dal mesoderma del corion si spostano all'interno dei villi, generando uno stroma connettivale che modifica i villi primari in villi secondari.

Questi ultimi, crescendo, ramificano su tutta la superficie del corion ed al termine della terza settimana evolvono nuovamente, diventando ora villi terziari. Essi sono quindi ora costituiti internamente da vasi sanguigni (alcuni si sono generati in situ, altri provengono da migrazioni di vasi sottostanti).

Durante tutte queste trasformazioni, le cellule del citotrofoblasto situate nei villi, continuano a moltiplicarsi attraversando anche il sincizotrofoblasto. Quando queste cellule raggiungono la decidua, si spostano fino alla sua superficie, formando uno strato parallelo alla decidua, detto disco trofoblastico, il quale è diviso dalla decidua grazie ad una parete molto sottile di sinciziotrofoblasto.

A questo punto, quindi, il sincizio si trova fra due lamine discoidali: esternamente è situato il disco trofoblastico, mentre internamente si trova il disco corionico (nonché la cavità del corion). Per collegare questi due dischi sono fondamentali i villi ancoranti, mentre lo spazio fra i dischi consente il deflusso del sangue materno, ed è detto spazio intervilloso.

In questa fase dello sviluppo avvengono allo stesso tempo due processi:

- Il sinciziotrofoblasto si contrae attorno ai villi, e così aumenta lo spazio per il sangue materno e diminuisce di conseguenza il distacco fra sangue stesso e villi;
- Dai villi di ancoraggio si generano diverse diramazioni nello spazio intervilloso; queste diramazioni sono dette villi fluttuanti o villi liberi, creando strutture ad albero che aumentano di molto la superficie di contatto con il sangue della madre.

Tutte queste modifiche consentono alla placenta primitiva di acquisire la sua funzionalità. Infatti, a questo punto sarà in grado di diminuire quanto più possibile la distanza fra sangue della mamma e del feto, così da aumentare la superficie di scambio delle sostanze.

Il tutto avviene durante la terza settimana di sviluppo, originando delle regioni ben differenziate all'interno della placenta, a seconda delle varie interazioni fra decidua e villi.

La porzione vicina ai villi, ma che non si sporge nella cavità uterina è detta decidua basale, la porzione interposta fra villi e cavità uterina è detta decidua capsulare, infine l'ultima porzione rimanente che non è a contatto con i villi è detta decidua parietale (Embriologia, M. Barbieri, P. Carinci, terza edizione, 2015).

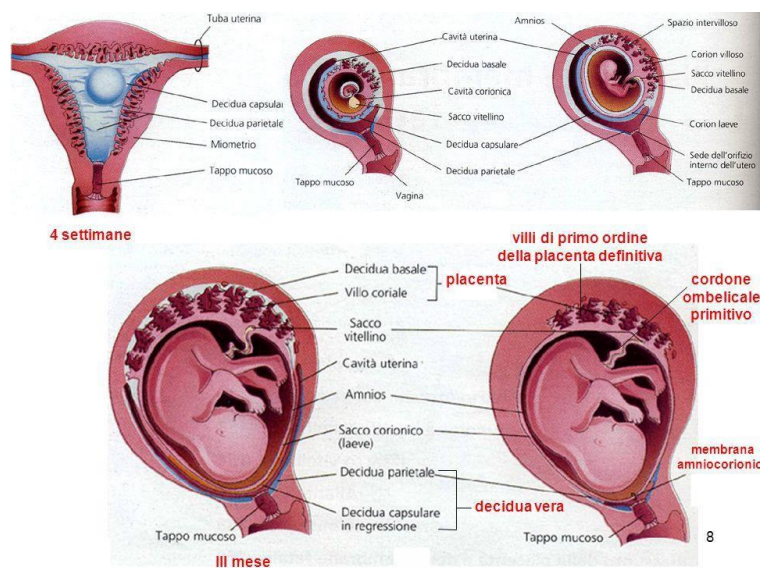


Fig.2 Placenta. (da <https://slideplayer.it/slide/993112/>)

2.1.3 PLACENTA DEFINITIVA

I villi coriali rivestono interamente tutta l'area del corion fino al termine dell'ottava settimana di gestazione, in maniera asimmetrica: infatti, i villi pi  vicini alla decidua basale sono tendenzialmente pi  lunghi dei restanti.

La struttura placentare rimane primitiva fino all'inizio del terzo mese, dove subir  profonde modificazioni.

Inizialmente, il corion si allargher  considerevolmente nella cavit  uterina, e i villi, all'opposto, non crescono con la stessa rapidit  e verranno quindi stirati durante questa espansione. Questo causa una diminuzione della dimensione dei villi, ed inoltre il flusso sanguigno che li attraversa si ridurr  sempre di pi  fino a sparire completamente.

A questo punto, i villi della decidua capsulare andranno incontro a degenerazione, finché il corion che li conteneva diviene una zona spoglia e prenderà il nome di corion liscio.

Al contrario, nell'area della decidua basale, per compensare la scomparsa dei villi del corion liscio e per soddisfare le esigenze del feto, i villi diventano più numerosi, si allungano e si ramificano ulteriormente. In questo modo, originano il corion frondoso o corion villosa.

Il numero dei villi nel corion frondoso, però, è limitato (da 20 a 40) e questo numero rimane costante durante tutta la gestazione. Essi daranno origine ai villi di prim'ordine, nella placenta definitiva, e inoltre vanno a dividere il disco corionico in 20/40 zone dette cotiledoni fetali. Da questi villi si creeranno poi dei villi di secondo ordine, poi anche di terzo, e così avanti. In parte, certi di questi si spingeranno fino alla decidua basale e diventeranno villi di ancoraggio, diversi invece rimangono in libertà nello spazio intervilloso.

In questo modo, la placenta crescerà perché questo albero villosa andrà ad occupare lo spazio sopra alla zona del cotiledone fetale, e quindi aumenterà il loro volume, anche di 500 volte.

L'unione fra corion frondoso e decidua basale genera la placenta definitiva. Questa struttura sarà ben visibile dal quarto mese di gestazione, dove si crea la tipica forma discoidale della placenta umana.

Non solo il corion si espande lungo il terzo mese, ma anche l'amnios si ingrandisce, addirittura con velocità superiore a quella del corion. Questo è fondamentale affinché il sacco amniotico riempia tutta la cavità disponibile dentro al corion, per accostarsi poi ad esso. In questo modo, assieme alla parete del corion, potrà formare la membrana corioamniotica. Sempre nel corso della sua estensione, il sacco amniotico circonda sia il peduncolo ombelicale che il dotto del sacco vitellino, dando in questo modo origine al cordone ombelicale primitivo.

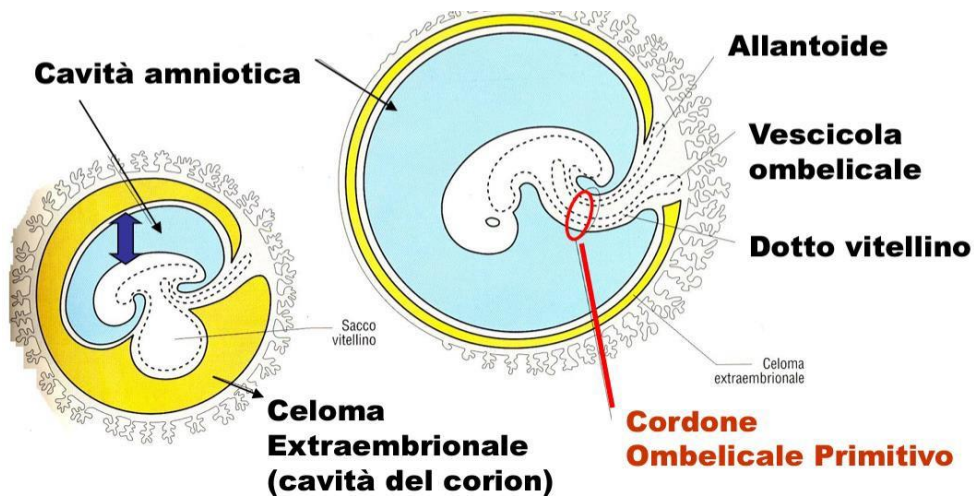


Fig.3 sviluppo del sacco amniotico. (da hrome-
 extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.unife.it/medicina/lm.medicina/studiare/minisiti/istologia-ed-
 embriologia/materiale_didattico/embriologia/2015-16/lezione-9_C)

Quasi al termine del terzo mese, il corion accelera la sua espansione grazie all'estensione stessa dell'amnios, poiché gli si è ancorato internamente. In questo modo, potrà in poco tempo invadere tutto lo spazio utilizzabile dentro alla cavità uterina; facendo questo porterà a contatto la decidua capsulare con la decidua parietale. In conseguenza a tutto ciò, alla fine della dodicesima settimana di gestazione, non si avranno più due decidue, ma una soltanto, che verrà chiamata decidua vera, in quanto sarà poi colei che verrà espulsa durante il secondamento.

In sintesi, la genesi della placenta primitiva accade nel terzo mese di gestazione, in accompagnamento alla creazione della decidua vera, della membrana corioamniotica e del cordone ombelicale primitivo, in contemporanea anche alla scomparsa del celoma extraembrionale e della cavità dell'utero.

Nel corso dello sviluppo placentare, poi, il disco trofoblastico si assottiglia sempre di più fino a scomparire totalmente intorno alla 24° settimana.

Questa sparizione fa sì che la decidua basale arrivi ad accostarsi ai villi e in quest'area di unione si genera lo strato compatto della decidua, e ciò che resta invece origina lo strato spongioso.

A partire dallo strato compatto si generano delle estensioni dette setti deciduali che entrano nello spazio intervilloso e lo dividono in aree. Giungono fino alla decidua basale e la ripartiscono in parti dette cotiledoni materni.

Al termine della gestazione, la placenta a “termine” possiede un diametro di 15-20 cm, uno spessore di 3 cm ed un peso all’incirca di 500-600 g.

La zona a contatto materno ha forma convessa ed è rivestita da decidua basale spongiosa; inoltre, essa mostra 10-30 sporgenze che coincidono con i cotiledoni materni. La zona fetale è invece ricoperta dalla membrana corioamniotica, che le conferisce un’apparenza liscia ed ospita il sito di inserzione del cordone ombelicale.

2.1.4 CORDONE OMBELICALE

Il cordone ombelicale definitivo si genera in seguito a tre importanti modifiche che avvengono durante il corso della gestazione. Già al termine della terza settimana, compaiono i vasi sanguigni che trasformano il peduncolo di connessione in peduncolo ombelicale.

Al termine della dodicesima settimana, durante l’estensione dell’amnios, il peduncolo ombelicale va a trovarsi a contatto con il dotto vitellino, ed intorno ad essi si genera uno strato di membrana amniotica che li riveste, originando così il cordone ombelicale primitivo, che al suo interno conterrà allantoide, vena e arterie ombelicali, dotto e vasi vitellini. Durante il corso dei 3 mesi che seguiranno, l’allantoide, i vasi ed il dotto vitellino si occluderanno, dando così origine al cordone ombelicale definitivo. Sarà quindi esternamente ricoperto da membrana amniotica e internamente presenterà invece una vena ombelicale e due arterie, rivestite da più massicci strati di tessuto muscolare liscio (Embriologia, M. Barbieri, P. Carinci, terza edizione, 2015).

2.1.5 CIRCOLAZIONE PLACENTARE

Giungendo al termine della gestazione, il sangue della madre che si trova nella placenta ha un volume che si aggira sui 150 ml, e subisce ricambi 3-4 volte al minuto, ne consegue che il flusso ematico che la percorre è decisamente alto; infatti, sono circa 450/600 ml al minuto.

Il sangue della madre giunge nella placenta grazie alla presenza di 80/100 arterie spirali, le quali insieme alla decidua basale creano un collegamento che aumenta in automatico la pressione. Le pareti endoteliali delle arterie spirali modificano il proprio spessore, poco

prima dell'entrata nella decidua. Questo è possibile attraverso una sostituzione delle cellule che prima erano basse e squamose, ma poi diventano colonnari e alte; in questo modo c'è un restringimento del lume arterioso, con conseguente aumento della pressione, secondo la legge di Poiseuille.

Grazie a questa modifica istologica, la pressione arriva a 70-80 mmHg, molto differente dallo spazio intervilloso dove si aggira sui 10 mmHg. In conseguenza di questa differenza pressoria, il sangue della mamma può giungere all'interno, dove incontra i villi coriali, ma, a causa di una forte pressione in ingresso, attraverserà molto velocemente lo spazio intervilloso per andare a colpire la parete del disco corionico. In seguito a questa collisione, il sangue della madre defluisce indietro e scorre in maniera più lenta attorno ai villi coriali, consentendo gli scambi delle sostanze, raggiungendo il vero scopo di questa circolazione.

Durante questo stato di deflusso, il sangue viene indirizzato verso la decidua grazie ai setti che definiscono i cotiledoni materni, in quanto fungono da argini e non consentono al sangue di disperdersi eccessivamente nello spazio intervilloso.

Il sangue della madre arriva infine alla decidua basale, in corrispondenza dell'imbocco delle vene uterine, dove la pressione è all'incirca di 8 mmHg, venendo così assorbito nelle vene per poi defluire dalla placenta.

Per quanto riguarda la circolazione fetale, invece, il sangue si immette nei villi dalle arterie e fuoriesce attraverso le vene ombelicali, circolando quindi dalle arterie alle vene, senza eseguire il percorso contrario, questo perché la pressione arteriosa, 48 mmHg, è maggiore di quella venosa, 24 mmHg.

Mediamente, la pressione del flusso sanguigno fetale nei villi è circa di 30 mmHg, ed è fondamentale che sia costantemente maggiore della pressione nello spazio intervilloso, in modo tale da evitare il collasso delle pareti dei vasi sanguigni, questo perché il sangue continua a scorrerci all'interno.

Al termine della gestazione, i villi coriali avranno raggiunto un'ampia superficie, con maggior esposizione nei confronti del sangue materno; in questo modo si aumenta nettamente la superficie per gli scambi fra mamma e bambino.

Sangue materno e sangue fetale sono obbligatoriamente separati grazie ad un complesso di membrane, che prende il nome di membrana placentare, ma può anche essere chiamata barriera placentare, proprio per evidenziare l'importanza della separazione fra i due torrenti ematici. Nonostante venga definita "barriera", consente comunque il passaggio di tutte

quelle sostanze che sono fondamentali per il corretto sviluppo del feto. Questa membrana è costituita solamente da tessuti di derivazione fetale, perché i tessuti della mamma vengono sostituiti dal sinciziotrofoblasto e in questo modo il sangue materno va ad essere confinante con i villi del feto. Per questo motivo la placenta è definita emocoriale.

La creazione della membrana placentare avviene intorno alla terza settimana di gestazione, durante il processo di genesi dell'apparato circolatorio primitivo. Manterrà questa struttura primitiva fino al sesto mese, quando in seguito ad una serie di modificazioni diverrà definitiva e resterà tale fino al termine della gravidanza.

È definita primitiva fino a quando sono presenti quattro diversi livelli fra sangue della mamma e del feto:

- Sinciziotrofoblasto
- Citotrofoblasto
- Tessuto connettivo
- Endotelio dei vasi sanguigni

Questo cambia nel corso dei mesi poiché intorno al sesto il citotrofoblasto si modifica fino a scomparire e in seguito anche i vasi sanguigni migreranno sempre più verso l'esterno. Si origina così la struttura definitiva della membrana placentare, che avrà quindi solo due strati:

- Sinciziotrofoblasto
- Endotelio dei vasi sanguigni

Nonostante il suo spessore ora si sia ridotto a qualche micron, la sua superficie è comunque vasta: fino a 10 m². In conseguenza di questo, qualche volta, può accadere che avvenga una rottura involontaria e quindi possano avvenire scambi fra sangue della mamma e del feto, ma succede molto di rado. Infatti, il momento in cui c'è maggior contatto fra sangue materno e fetale è durante il parto, ed è anche il momento in cui c'è una maggior probabilità di scatenare nella madre una risposta immunitaria, come la produzione di anticorpi anti-Rh nel caso in cui lei sia Rh negativa ed il feto positivo, causando situazioni gravi in eventuali future gravidanze, come eritroblastosi fetale o ittero nucleare.

2.1.6 FUNZIONI DELLA PLACENTA

Principalmente, la placenta, svolge diverse funzioni:

- Funzione respiratoria
- Funzione nutritiva
- Funzione di scambio di sostanze

Non si limita a queste due azioni, infatti si occupa di agire anche come fegato, reni, sistema immunitari e ghiandola endocrina.

Diversi meccanismi che si occupano del trasporto di sostanze attraverso la placenta attualmente non sono ancora noti, ma se ne conosce in generale il funzionamento.

Ossigeno e anidride carbonica sfruttano la diffusione passiva per attraversare la membrana placentare. In particolare, l'ossigeno sfrutta la differenza di tensione fra sangue materno, dove è maggiore, e sangue fetale, dove è minore, consentendo quindi il passaggio. L'anidride carbonica invece lavora all'opposto: la tensione è maggiore nel sangue fetale, per questo motivo diffonderà dal feto alla madre attraverso la membrana placentare. Infatti, per colpa dell'effetto Bohr che dice che tutti i fattori che aumentano la tensione dell'anidride carbonica diminuiscono proporzionalmente la capacità di trasportare ossigeno del sangue, spiega il motivo del rischio aumentato di morte per feto di madri fumatrici, in quanto hanno ridotta capacità di trasportare ossigeno al feto.

L'acqua, invece, sfrutta l'osmosi per attraversare la membrana placentare e diffonde sia nel sangue che nell'amnios, dove garantisce la sostituzione del liquido amniotico per formarne di nuovo. Giungendo al termine della gestazione il liquido amniotico presenterà un volume di 1 litro e viene sostituito ogni 3 ore. Inoltre, può contenere piccole tracce di urina che però saranno filtrate attraverso la placenta, difatti qui funge da vero e proprio rene. Nonostante l'acqua passi per osmosi, il quantitativo di liquido dell'amnios è regolato da molteplici meccanismi di controllo per ora non molto noti.

Per quanto riguarda il trasporto di elettroliti (sodio, cloro, potassio) il loro trasporto avviene per diffusione passiva. Contrariamente, calcio e fosfati tendono ad accumularsi nel feto, per favorire l'accrescimento e lo sviluppo osseo, ma sfruttano meccanismi non ancora noti di diffusione facilitata.

Gli zuccheri invece passano attraverso la membrana placentare con un trasporto di tipo attivo. Questo avviene grazie ad una serie di enzimi presenti nella placenta che sintetizzano e accumulano glicogeno, partendo dal glucosio, ecco che qui funge un po' da fegato.

Per le proteine non c'è un vero trasporto: infatti, esse vengono scisse a livello della placenta in amminoacidi che in seguito verranno trasportati mediante trasporti attivi e arriveranno ai villi dove si inizierà già a costruire le proteine fetali.

Questo non vale per tutte le proteine; infatti, le immunoglobuline G (IgG) sono trasportate integre a recettori sul sinciziotrofoblasto. Questo tipo di trasporto conferisce al feto un'immunità di tipo passivo nei confronti di diverse patologie infettive come difterite, scarlattina e morbillo. Questo non vale, però, per tutte le immunoglobuline: infatti le IgM non vengono passate al feto, ma non si conosce il perché.

Per quanto riguarda i lipidi, questi subiscono un processo simile a quello delle proteine poiché vengono inizialmente scissi e poi riformati nella placenta. Invece le vitamine attraversano la membrana senza difficoltà, esclusa la vitamina K, poiché anche basse dosi potrebbero causare importanti emorragie.

Gli ormoni di tipo steroideo attraversano con facilità la membrana placentare, motivo per cui la loro diretta somministrazione alla madre genera effetti altrettanto diretti anche sul feto: per esempio, ormoni androgeni agiscono mascolinizzando i genitali esterni femminili, in funzione della dose e del periodo di assunzione.

All'opposto, gli ormoni peptidici sono fermati dalla membrana placentare, ma alcuni passano ugualmente, in maniera molto più lenta, come ad esempio la tiroxina.

Fra le funzioni di principale importanza della placenta, è bene ricordare la sua attività di barriera nei confronti delle sostanze tossiche e di agenti patogeni, nonostante vi siano diverse eccezioni ed elevata mutevolezza.

Fra i farmaci che passano la barriera senza difficoltà ricordiamo gli antibiotici, tra cui le cefalosporine che sono causa di notevoli malformazioni.

Anche i virus possono superare questa barriera, infatti AIDS epatite, morbillo e poliomielite passano senza problemi. Stessa cosa è valida anche per altri microrganismi, come le spirochete che causano la sifilide.

Tornando al discorso ormonale, la placenta è un organo fondamentale per la sua capacità di produzione di diversi ormoni, fungendo in questo modo da vera e propria ghiandola endocrina. È in grado di immetterli nel torrente ematico. Fra questi ricordiamo la gonadotropina corionica umana (hCG), il lattogeno placentare (hPL), il progesterone e gli estrogeni.

In conclusione, viste le caratteristiche strutturali e funzionali, la placenta è definita:

- Discoidale, grazie alla sua forma;
- Emocoriale, grazie alla circolazione materno fetale;
- Deciduale, per la trasformazione che fa l'endometrio in decidua;
- Corio-allantoidea, in quanto i vasi sanguigni che congiungono l'embrione al corion, si generano intorno all'allantoide.

2.2 ISTOLOGIA PLACENTARE

La placenta è una struttura di essenziale importanza per la crescita e lo sviluppo corretto della gestazione. Per questo motivo è importante l'esame istologico della placenta soprattutto nei casi in cui ci siano state complicanze sia nella gravidanza, sia durante il parto (<https://www.medicinamaternofetale.it/medicina-materna/placenta/esame-istologico-placentare>).

La prima analisi da effettuare è sul tessuto a fresco, che deve poi essere conservato in formalina per poterlo successivamente campionare ed eseguire sezioni da includere in paraffina. In questo modo si possono poi ottenere delle sezioni visualizzabili al microscopio attraverso diverse colorazioni.

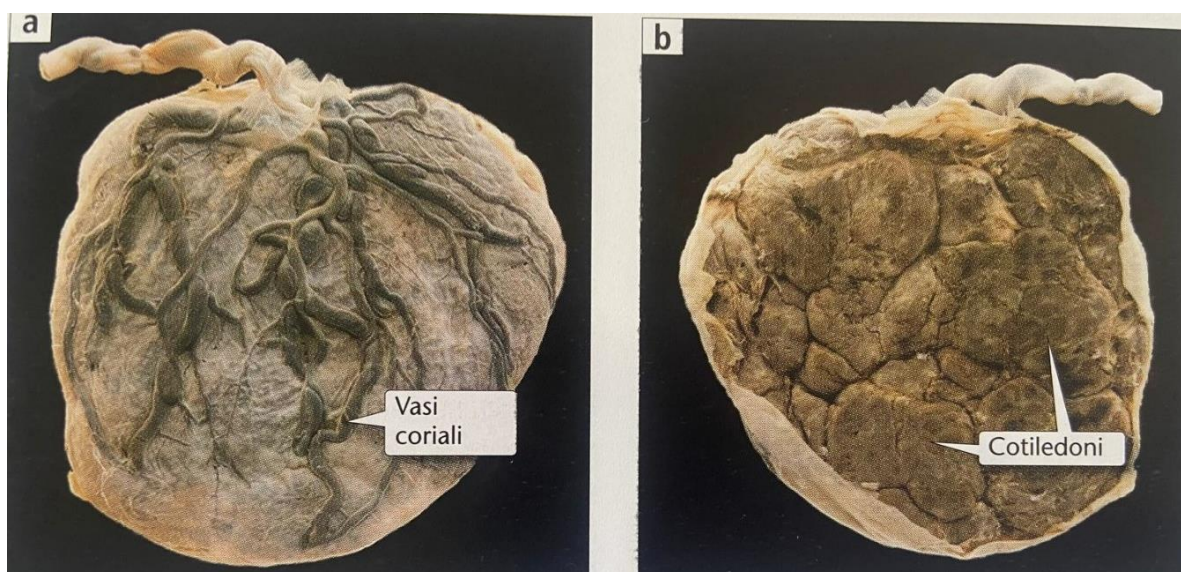


Fig. 4 placenta, campione museale. (Istologia funzionale, J.B. Kerr, 2012.)

Nella figura 4a, è possibile apprezzare il versante fetale della decidua, con annesse le ramificazioni dei vasi ombelicali. Il fatto che abbia questo aspetto liscio è da attribuire alla membrana amniotica che la riveste superficialmente.

Nella figura 4b, invece, si osserva il lato materno della placenta. Sono visibili i numerosi lobi costituiti dai cotiledoni, i quali sono separati dai setti della decidua basale. All'interno di ogni lobo, o cotiledone, sono presenti diverse organizzazioni villose che si ramificheranno nei villi vascolarizzati.

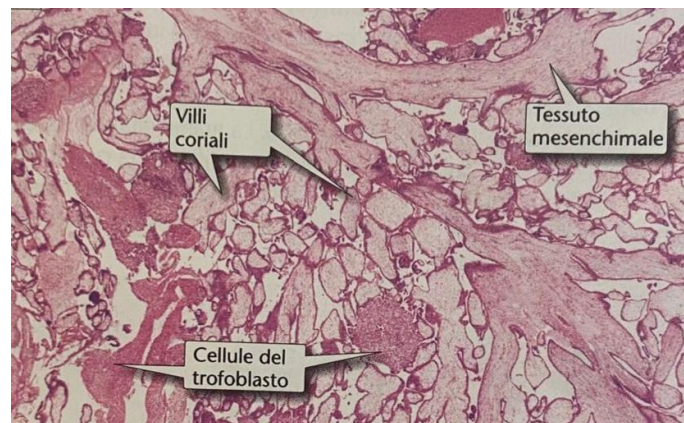


Fig. 5 tessuto placentare umano precoce. (Istologia funzionale, J.B. Kerr, 2012.)

In figura 5 si notano le ramificazioni dei villi coriali, che tendono ad estendersi negli spazi più vuoti, che coincidono con gli spazi o lacune intervilliose, le quali nel tessuto vivo, sono invasi dal sangue della madre. Il core dei villi è costituito da tessuto mesenchimale, però l'assenza di vasi sanguigni interni, decreta che questi villi sono secondari. I villi primari sono allungamenti solidi delle cellule di citotrofoblasto. La tecnica utilizzata per questa analisi è l'osservazione microscopica (con obiettivo 15x) della sezione istologica ottenuta mediante colorazione con ematossilina ed eosina (EE) (Istologia funzionale, J.B. Kerr, 2012).

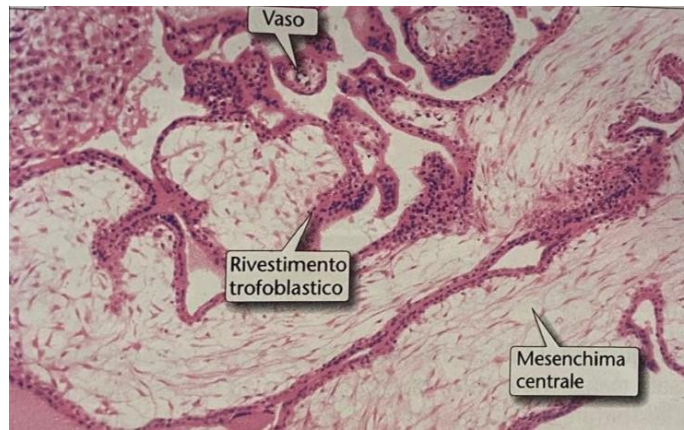


Fig.6 tessuto placentare. (Istologia funzionale, J.B. Kerr, 2012.)

In figura 6 si evidenzia la presenza di mesenchima centrale, rivestito all'interno da uno strato di cellule del citotrofoblasto e all'esterno da cellule del sinciziotrofoblasto. Inoltre, si può notare come il trofoblasto, crescendo, origini nuove ramificazioni dei villi. I villi secondari si sviluppano internamente ai villi primari, e intorno alla ventunesima settimana diventano villi terziari. Gli spazi che sono ancora vuoti vengono riempiti dal sangue materno, nel tessuto vivo. Anche in questo caso, come nel precedente, la tecnica usata è la colorazione in EE, con osservazione al microscopio, con obiettivo 60x.

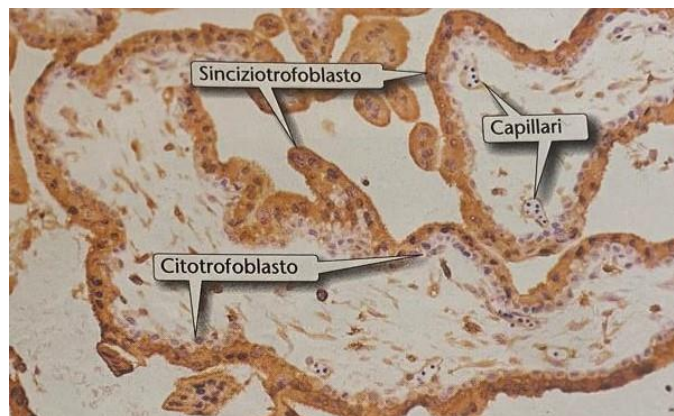


Fig. 7 tessuto placentare. (Istologia funzionale, J.B. Kerr, 2012.)

In figura 7, infine, si osserva un'altra tecnica di analisi, ovvero la tecnica immunocitochimica, utilizzata in questo caso per evidenziare la presenza della gonadotropina corionica umana nello strato del sinciziotrofoblasto che ricopre la superficie delle ramificazioni dei villi. Si possono evidenziare i primi capillari internamente ai villi,

questo è indice della trasformazione da villi secondari a terziari. Anche in questo caso, per l'analisi della sezione, è poi stata fatta colorazione EE e osservazione microscopica al 60x.

2.3 PATOLOGIE PLACENTARI

L'importanza relativa allo studio delle malattie della gestazione ed eventuali patologie placentari è data dal fatto che sono la principale causa di morte fetale intrauterina o perinatale, oltre a malformazioni congenite, ritardi di sviluppo intrauterino, morte della madre o del feto o di entrambi. Nello specifico, se le malattie si sviluppano a partire dal terzo trimestre, sono spesso associate a problemi correlati con la struttura complessa della placenta definitiva. Possono presentarsi diverse situazioni come la completa sospensione del flusso ematico attraverso il cordone, infezioni relative alle membrane corioamniotiche, difetti nella circolazione utero-placentare, e diverse altre, i cui effetti possono essere molto vari e spaziano sia su problemi relativi all'accrescimento del feto, che alla salute della madre.

2.3.1 ABORTO SPONTANEO

L'aborto spontaneo, detto anche "miscarriage", consiste nell'interruzione spontanea della gestazione, se avviene entro la 20° settimana. Solitamente si verificano con maggior frequenza intorno alla 12° settimana. Nella maggioranza dei casi, i motivi dell'interruzione della gestazione non sono noti, si sono però evidenziate varie possibili cause, sia fetali che materne. Tra le più conosciute ci sono:

1. Anomalie cromosomiche fetali, riscontrate nel 50% degli aborti spontanei precoci.
2. Fattori endocrini materni come difetti nella fase luteale, oppure diabete non controllato.
3. Difetti fisici dell'utero fra cui leiomiomi sottomucosi o vere malformazioni che non consentono l'impianto dell'ovulo.
4. Disturbi sistemici dei vasi della madre, come coagulopatie o ipertensione.
5. Infezioni da protozoi, batteri e numerosi virus.

2.3.2 GRAVIDANZA ECTOPICA

La gravidanza ectopica consiste nell'impianto dell'embrione in una zona qualunque, ma diversa dalla corretta locazione intrauterina. Fra i siti più comuni troviamo la localizzazione extrauterina, a livello della tuba di Falloppio, circa nel 90% dei casi, ma per la minoranza dei casi si possono situare anche a livello delle ovaie, della cavità addominale, oppure nella porzione intrauterina tubarica. L'incidenza di queste gestazioni è di circa il 2%.

Fra le principali condizioni predisponenti troviamo la più importante, ovvero una pregressa malattia infiammatoria pelvica, che può portare ad una cicatrizzazione intraluminale delle tube (salpingite cronica).

L'incidenza di una gravidanza ectopica è aumentata anche nei casi in cui ci siano cicatrizzazioni e aderenze peritubariche, causate in alcuni casi da appendicite, endometriosi o precedenti interventi chirurgici. Anche l'uso di contraccettivi intrauterini causa un aumento drastico della probabilità di manifestare questa alterata gestazione.

Invece, per quanto riguarda le gravidanze addominali, sono frequenti nei casi in cui l'ovocita fecondato non entra nella tuba, oppure esce nella porzione finale di essa, dove si trovano le fimbrie.

Nonostante sia in luoghi diversi da quelli della sua normale crescita, l'ovocita fecondato prosegue comunque nel suo sviluppo e genera sia tessuto placentare sia il sacco amniotico. Anche il luogo dell'impianto può subire le caratteristiche modifiche deciduali.

A livello patologico, però, queste gravidanze ectopiche con sede tubarica, sono caratterizzate dalla comparsa di dolore addominale importante e di sanguinamento vaginale, intorno alla sesta/ottava settimana dall'ultimo ciclo mestruale. Questa sintomatologia è correlata alla rottura della tuba di Falloppio. In questi casi, la paziente può manifestare shock emorragico in breve tempo, ecco perché la diagnosi tempestiva è fondamentale. Tale diagnosi viene basata su: i livelli di gonadotropina corionica umana; attraverso analisi ecografica pelvica; biopsia endometriale per mostrare la decidua, priva di villi coriali e di sede di impianto, oppure in laparoscopia.

Malgrado l'eventuale diagnosi precoce, questo tipo di gestazione è comunque causa del 4/10% delle morti durante la gravidanza (Le Basi Patologiche Delle Malattie, V. Kumar, 9° Edizione, 2015).

2.3.3 ANOMALIE DI IMPIANTO PLACENTARE

Solitamente, quando si parla di impianti placentari di tipo anomalo, si fa riferimento anche a complicanze gravi. Distinguiamo le due principali tipologie di impianto anomalo: placenta previa e placenta accreta.

- **PLACENTA PREVIA:** è una complicazione di tipo ostetrico, con incidenza di 5,2 su 1000 gravidanze. In questa condizione, la placenta ostruisce parzialmente o interamente l'orifizio interno della cervice. La placenta previa è stata catalogata in quattro tipologie: placenta bassa, placenta previa marginale, parziale e completa. La patogenesi di tale condizione attualmente non è ancora chiara. La placenta previa è collegata a esiti avversi della madre e del feto, tra cui aderenza della placenta, emorragia antepartum, emorragia postpartum, restrizione della crescita intrauterina (IUGR), tromboflebite, travaglio pretermine, setticemia e morte (The risk factors associated with placenta previa: An umbrella review, Ensiyeh Jenabi et al.).

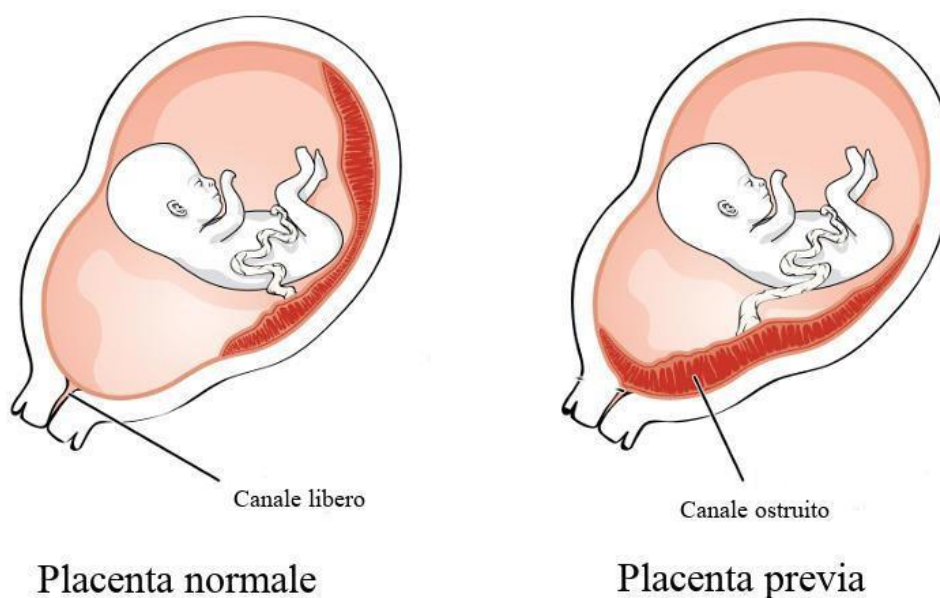


Fig.8 Placenta previa (<https://healthy.thewom.it/gravidanza/placenta-previa/>).

- **PLACENTA ACCRETA (PA):** è causata dalla totale o parziale mancanza della decidua, e questo comporta che il tessuto villosa aderisca direttamente al miometrio. Ne consegue un mancato distacco della placenta alla nascita (Le basi patologiche delle malattie, V. Kumar, 9° edizione, 2015). Causa importanti emorragie post partum, potenzialmente mortali. Fra il 60% delle gravidanze manifestanti questa condizione, c'è stato un pregresso parto cesareo. La PA è classificata in base al grado di spessore d'invasione miometriale. Nel caso in cui i villi coriali invadano a tutto spessore il miometrio si utilizza il termine Placenta Increta, invece il termine Placenta Percreta descrive l'invasione di tutto il miometrio fino alla tonaca sierosa e, talvolta, con interessamento degli organi vicini quali la vescica. Questa condizione è sovraccaricata da un'alta incidenza di mortalità materno-fetale. Un anormale inserimento placentare è la causa del 50-65% delle isterectomie post-parto. L'emorragia post-partum nel mondo è la prima causa di morte materna (S. Politi, Rivista di ostetricia ginecologia pratica e medicina perinatale vol. XXIX n.1/ 2014).

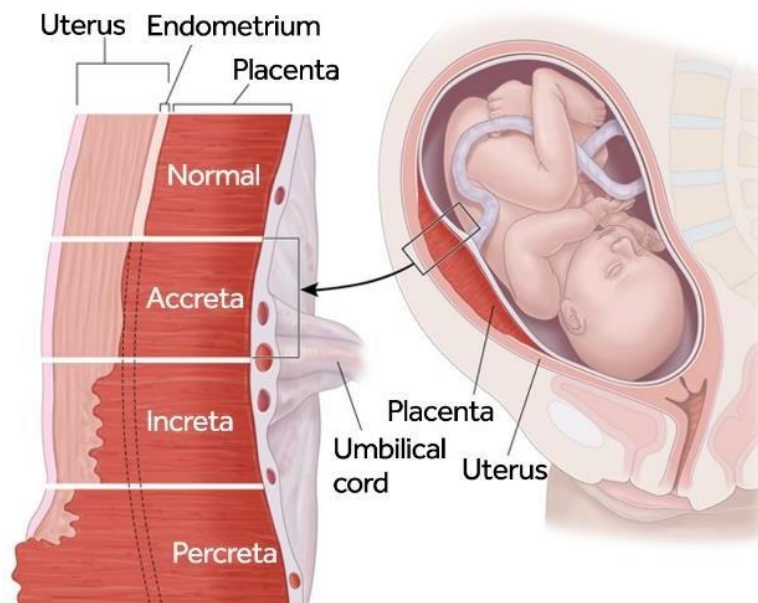


Fig.9 Placenta accreta, increta, precreta (<https://www.stonybrookmedicine.edu/patientcare/obgyn/accreta>).

2.3.4 INFEZIONI PLACENTARI

Questo tipo di infezioni può svilupparsi seguendo due percorsi: infezioni ascendenti attraverso il canale del parto oppure infezione del sangue che attraversa la placenta (transplacentare).

Fra le due tipologie, le infezioni di tipo ascendente sono decisamente le più frequenti e quasi sempre di origine batterica. Spesso si localizzano a livello delle membrane, causandone il distacco e il conseguente parto pretermine. L'aspetto del liquido amniotico in questi casi può risultare opaco, con essudato purulento. Inoltre, le membrane corioamniotiche possono presentare a livello istologico dei neutrofili, accompagnati da edema e congestione vasale. Questo tipo di infezioni può causare anche, di frequente, vasculite nei vasi fetali e ombelicali.

È più raro il caso delle infezioni ematogene che possono interessare la placenta e riguardano principalmente le costituenti del complesso TORCH, acronimo di toxoplasmosi e altre (tra cui sifilide, tubercolosi, listeriosi) rosolia, citomegalovirus, herpes simplex. Questi possono dar forma, nei villi, a situazioni di infiammazione cronica detta villite cronica.

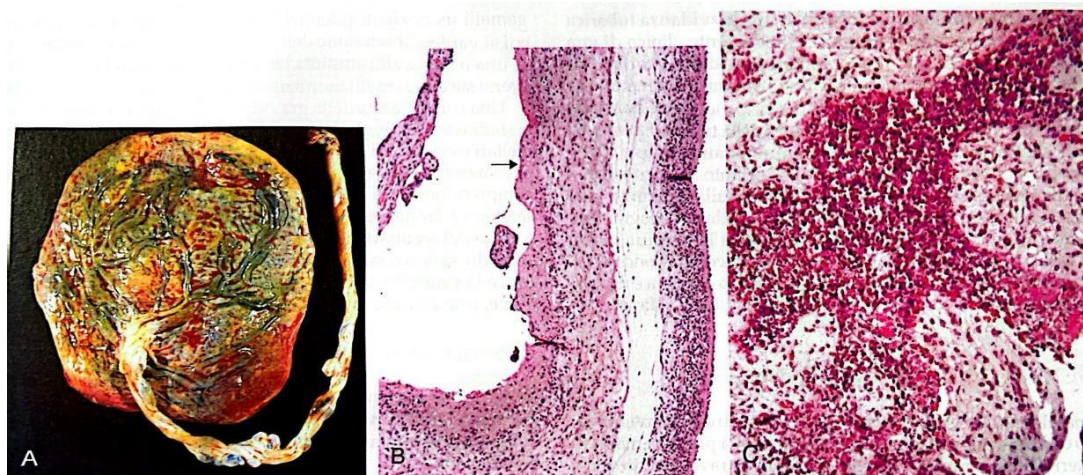


Fig. 10. A) Esame macroscopico della placenta ove sono presenti membrane verdastre riconducibili a infezione. B) Foto effettuata al microscopio ottico, dove si apprezza un essudato denso, che appare sulla superficie amniotica, in corrispondenza della freccia. C) Intervillosite necrotizzante, dovuta da infezione da *Listeria* (Le basi patologiche delle malattie, V. Kumar, 2015).

2.3.5 PREECLAMPSIA E ECLAMPSIA

“La preeclampsia è una sindrome sistemica caratterizzata da diffusa disfunzione endoteliale materna, che si presenta con ipertensione, edema e proteinuria durante la gravidanza” (Le basi patologiche delle malattie, V. Kumar, 2015).

Può presentarsi nel 3-5% delle donne in stato interessante, intorno al terzo trimestre e con frequenza maggiore nelle donne primipare. In alcune di queste pazienti si può sviluppare una sintomatologia anche più severa, con convulsioni, e questo sviluppo più grave della patologia è definito eclampsia. Altre complicanze associate a questa condizione sono l'ipercoagulabilità, insufficienza renale acuta ed edema polmonare. La preeclampsia è differenziata dall'ipertensione gestazionale poiché in quest'ultima non c'è proteinuria.

Nel 10% dei casi in cui si presenta la preeclampsia grave, si manifesta anche anemia emolitica microangiopatica, livelli alti di enzimi epatici e bassa conta piastrinica. Questa condizione è nota come HELLP.

La patogenesi ed i meccanismi che consentono la manifestazione della patologia sono attualmente ancora studiati, ma c'è una chiara correlazione con la placenta in quanto si è evidenziato come, una volta espulsa, i sintomi scompaiano.

Alcuni recenti studi hanno evidenziato che i principali sintomi della patologia (disfunzione endoteliale materna, ipertensione, edema) sono mediati da fattori che derivano dalla placenta e che sono liberati dentro al circolo materno. Nonostante questa liberazione di fattori e lo sviluppo della patologia incorrano verso la fine della gestazione, la patogenesi della malattia invece sembra essere collegata a eventi delle fasi iniziali della gravidanza e della genesi della placenta. Le principali modifiche fisiopatologiche sono:

- Vascolarizzazione placentare anomala; la placenta risulta poco dotata per supportare la crescente richiesta circolatoria della gravidanza in avanzamento, favorendo una possibile ischemia placentare.
- Disfunzione endoteliale e disequilibrio dei fattori angiogenici e antiangiogenetici; sono conseguenza dell'ipossia causata dal punto precedentemente descritto.
- Anomalie della coagulazione, che possono portare all'originarsi di trombi che agiscono in particolare su fegato, ipofisi, reni e cervello.

Il trattamento di tale patologia è da valutare a seconda della settimana di gestazione e della gravità della malattia. Nel caso di gravidanze a termine, si sceglie il parto a prescindere dalla

gravità delle condizioni. Per le gravidanze non ancora a termine, il parto potrebbe non essere la miglior scelta per il feto, per cui si procede con un attento monitoraggio della gestazione. Tuttavia se siamo in una situazione sintomatologica severa con manifestazioni HELLP si sceglie il parto in ogni caso. In generale i sintomi si attenuano gradualmente con il termine della gravidanza, sebbene possa restare aumentato il rischio di patologie vascolari cardiache e cerebrali (Le basi patologiche delle malattie, V. Kumar, 2015).

2.3.6 MALATTIA TROFOBLASTICA GESTAZIONALE

Questa condizione comprende un insieme di tumori e condizioni simili consistenti di un'alterata proliferazione del tessuto placentare, villosa o trofoblastica. Le forme più frequenti sono: mola idatiforme, mola invasiva e tumore trofoblastico del sito placentare (PSTT).

Nel caso di mola idatiforme, è importante che sia identificata poiché questa condizione si associa spesso al rischio di malattia trofoblastica persistente (mola invasiva) e al coriocarcinoma.

Le mole sono istologicamente individuate grazie al rigonfiamento cistico dei villi coriali, seguito da proliferazione trofoblastica di entità mutevole. La diagnosi avviene già intorno alla 9^a settimana di gestazione, grazie ad un'indagine ecografica. Il rischio che si manifesti questa condizione è aumentato in tarda età o in giovanissima età gestazionale, come in adolescenza.

L'aspetto tipico di queste mole è quello di una massa di consistenza friabile, costituita da villi rigonfi edematosi, detti idropici, che risultano simili a cisti con pareti assottigliate, lucide e simili a grappoli d'uva.

Nella maggior parte delle gestanti in cui c'è questa condizione, si va incontro ad aborto spontaneo, oppure si procede con raschiamento intrauterino poiché si è vista questa anormale proliferazione in seguito ad ecografia. Inoltre, anche i livelli di gonadotropina corionica (hCG) sono drasticamente aumentati in questa situazione. In seguito al termine di questa gravidanza patologica, le donne vengono monitorate ancora per i successivi 6-12 mesi, per assicurarsi che i livelli di hCG tornino ai parametri normali. Se questo non dovesse accadere, potrebbe essere sintomo di mola persistente o invasiva. Questa condizione è piuttosto grave poiché si fa riferimento ad una mola che entra nella cavità uterina e la può anche perforare.

In questa situazione la paziente potrebbe doversi sottoporre a chemioterapia e isterectomia per eliminare la mola.

Inoltre, esiste una condizione ancora più grave, ovvero lo sviluppo di coriocarcinoma gestazionale. È una neoplasia maligna delle cellule trofoblastiche, le quali derivano da precedenti gravidanze sia normali che non. È una condizione severa, in quanto è rapidamente invasiva e metastatizza ampiamente. Una volta identificata, però, risponde bene a chemioterapia. Ha un'incidenza piuttosto bassa nella popolazione. La sintomatologia si riconduce a perdite ematiche vaginali di colore scuro, anche dopo mesi dalla gravidanza o dal raschiamento. Anche in questo caso i livelli di hCG sono solitamente più elevati della norma, anche se in alcuni casi, se il tumore diviene necrotizzante, può produrne bassi livelli. Le metastasi si localizzano con frequenza maggiore su polmoni e vagina. La chemioterapia è efficace in coriocarcinomi gestazionali, mentre lo è meno con i coriocarcinomi non gestazionali.

Infine, possono manifestarsi anche tumori trofoblastici del sito placentare, che però costituiscono meno del 2% dei casi di neoplasia gestazionali. È una condizione di proliferazione neoplastica dei trofoblasti extravillosi. In questa patologia le manifestazioni tipiche sono un lieve aumento dei livelli di hCG, sanguinamento uterino anomalo o amenorrea, conseguente alla formazione di una massa uterina. Le pazienti con la patologia localizzata hanno prognosi ottima, meno frequente per le pazienti già metastatizzate.

2.4 PATOLOGIE PLACENTARI DA INQUINAMENTO

Le cause dei risultati negativi durante le gestazioni non sono ancora completamente chiare, ma, oltre alle malattie materne durante la gravidanza e le complicazioni del parto, ci sono prove che suggeriscono un ruolo significativo delle cause ambientali. Ad esempio, l'esposizione al fumo passivo, specialmente durante la gravidanza, è stata ampiamente studiata. Negli ultimi anni, le ricerche hanno anche evidenziato gli effetti negativi sull'aspetto riproduttivo della salute causati dall'inquinamento atmosferico e ambientale. La gravidanza è un periodo di vulnerabilità in cui le varie esposizioni possono portare a diversi effetti sulla madre, sul feto e sul nascituro. Il risultato degli inquinanti atmosferici che è simile a quello del fumo, è difficile da ricercare proprio perché si interseca con quello di altre esposizioni e, soprattutto, di patologie materne. Una particolarità è che il problema è per lo più mediato attraverso un danno alla placenta, organo centrale per la salute del feto. Prove crescenti correlano l'esposizione all'inquinamento atmosferico con esiti avversi in gravidanza, come parto pretermine, preeclampsia, ipertensione gestazionale, diabete e alterazioni cardiovascolari e dello sviluppo neurologico (D. Olsson et al, 2013). Il meccanismo della maggior parte di questi eventi è spiegato dai cambiamenti che si verificano nella placenta. Il particolato atmosferico (PM), l'ozono e gli ossidi di azoto conferiscono un aumento del rischio di preeclampsia e disturbi ipertensivi (M. Pedersen et al, 2014). Sebbene il tasso di esposizione effettivo della placenta all'inquinamento atmosferico non sia noto, è risaputo che il PM_{2,5} entra in circolazione, aggirando le cellule epiteliali polmonari (F. Kastury et al, 2017). Attualmente attraverso studi, si è dimostrato che il particolato può essere trovato all'interno delle cellule placentari (Nemmar et al, 200; Liu et al, 2018), ribadendo che questo tessuto è anche un bersaglio per l'inquinamento atmosferico. Campioni di placentate umane a termine esposte all'inquinamento atmosferico hanno mostrato alti livelli di metalli pesanti negli strati di sinciziotrofoblasto, si pensa quindi che le cellule del trofoblasto fagocitano attivamente le particelle contenenti metalli (Kaiglová et al, 2001). Inoltre, l'esposizione alle particelle diesel può causare danni al DNA e aumentare la produzione di citochine nel feto, suggerendo il trasferimento transplacentare delle particelle inquinanti dalla circolazione materna a quella fetale (Hougaard, 2008).

Visti tutti i risultati appena citati, con questo studio si è voluto ricercare un metodo efficace per valutare se anche in gravidanze sane e a termine ci fosse presenza di altri inquinanti come le microplastiche, metalli pesanti e fibre di amianto, ma soprattutto si è voluto valutare la fattibilità dell'uso di determinate metodiche per decidere che approccio utilizzare.

2.5 LE MICROPLASTICHE

A causa dell'ampia diffusione dell'utilizzo delle plastiche anche in ambito domestico, ne è presto derivato un grave problema a livello di inquinamento e non solo ambientale. Questo è principalmente causato dal fatto che, tale diffuso materiale, non è prodotto solo di un'unica forma o composizione chimica, bensì vanta numerose varietà e dimensioni, ed è particolarmente difficile da degradare.

Per questo motivo, dai materiali plastici si originano particelle che possono avere azione tossica sia dal punto di vista sanitario che ambientale.

Nel dettaglio, le microplastiche (MP) sono particelle di materie plastiche, prodotte direttamente o indirettamente dall'uomo, le cui dimensioni sono state convenzionalmente fissate dalla "European Food Safety Authority" (EFSA) tra 0,1 e 5000 micrometri.

I frammenti di misura inferiore, non rilevabili dall'occhio umano e compresi tra 0,001 e 0,1 micrometri, vengono definiti *nanoplastiche*.

Vengono divise in:

- *microplastiche primarie*, se disperse direttamente nell'ambiente. Sono create volontariamente di dimensioni ridotte, per essere impiegate, ad esempio, nei cosmetici (trucchi, detersivi, dentifrici), nelle vernici, nelle paste abrasive e nei fertilizzanti, per le loro proprietà esfolianti o per il mantenimento dello spessore, aspetto e stabilità del prodotto.
- *microplastiche secondarie*, se derivano da disgregazione di rifiuti plastici di maggiori dimensioni. Infatti, la plastica che si trova dispersa nell'ambiente, spesso deriva dallo smaltimento scorretto dei prodotti utilizzati. Rimanendo nell'ecosistema, viene sottoposta a processi di degradazione molto lenti a opera della luce, a processi termo-ossidativi o di biodegradazione che indeboliscono l'integrità del materiale di origine, portando alla frammentazione in pezzi inferiori ai 5 mm. Le MP secondarie costituiscono la quota maggiore delle MP disperse nell'ambiente (<https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/m/microplastiche#effetti-sulla-salute-umana-e-sull%E2%80%99ambiente>).

Si è evidenziato che entrambe le classi di microplastiche (primarie e secondarie) perdurano nell'ambiente in elevate quantità, in particolare negli ecosistemi acquatici. Questo accade in quanto la plastica si deforma ma non si decompone per molti anni, e quindi la si può ingerire e accumulare nel corpo e nei tessuti di molti organismi. L'intero ciclo e movimento delle microplastiche nell'ambiente non è ancora stato studiato in modo approfondito soprattutto per la difficoltà di analizzare una miscela di svariati tipi di plastica più o meno inerte. Il 77% del sangue delle persone testate dai ricercatori dell'Università Vrije di Amsterdam nel 2022 è risultato contenere microplastiche poiché esse possono viaggiare nel corpo e depositarsi negli organi (<https://ilsalvagente.it/2022/03/25/microplastiche-trovate-per-la-prima-volta-nel-sangue-umano/>).

I processi di assorbimento, distribuzione, metabolismo, uniti al potenziale tossico negli nell'uomo hanno attirato crescente attenzione (Vethaak e Legler, 2021). I risultati attuali suggeriscono che i soggetti assumono inevitabilmente MP attraverso l'ingestione, l'inalazione e il contatto cutaneo. Queste MP possono influenzare la salute umana interferendo con i processi metabolici. Gli impatti dannosi dell'esposizione ai MP sono ancora controversi e non del tutto compresi.

Gli effetti dei MP sulla salute umana possono essere suddivisi in tre categorie principali: effetti chimici, fisici e biologici e poi ulteriormente suddivisi per via di esposizione e potenziali effetti clinici, come illustrato dallo schema:

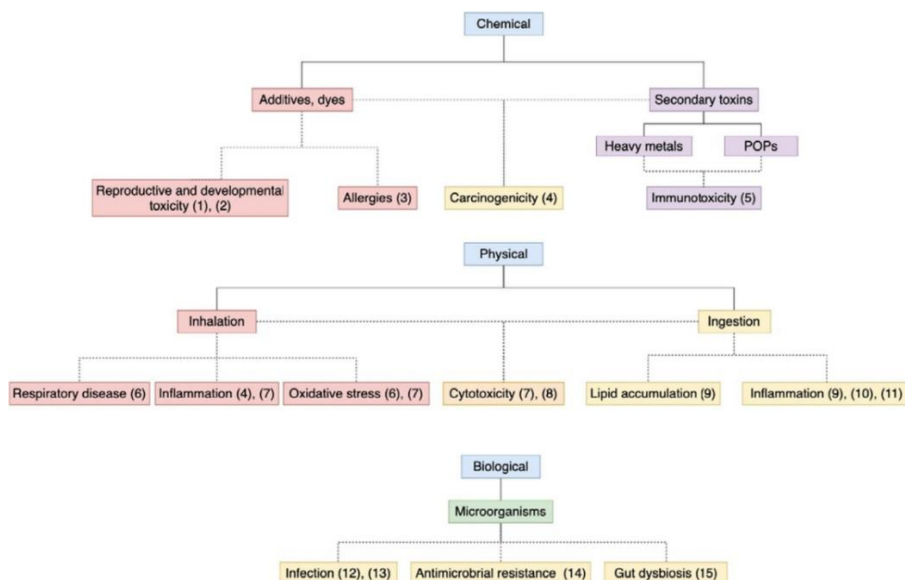


Fig.11 Schema sugli effetti tossici delle microplastiche (The potential effects of microplastics on human health: What is known and what is unknown, K. Blackburn, 2015).

Esistono prove che suggeriscono che additivi come coloranti o plastificanti potrebbero causare tossicità, cancerogenicità e mutagenicità (Gasperi et al. 2018) e da essi potrebbero essere rilasciate MP e accumularsi sulle superfici e nelle fonti d'acqua, con conseguenze sulla salute (Gasperi et al. 2018). Gli ftalati sono comunemente usati come plastificanti per fornire flessibilità alla materia prima. Sono additivi, quindi sono legati covalentemente al polimero e hanno maggiore probabilità di essere rilasciati e trasferiti nell'ambiente. Oltre l'80% dei plastificanti utilizzati nel mondo sono ftalati. È stato dimostrato che sono presenti nella polvere domestica (Abb et al. 2009; Ait Bamai et al. 2014), nell'urina umana (Jornet-Martínez et al. 2015) e nel latte materno (Main et al. 2006; Högberg et al. 2008). Esistono alcune prove che suggeriscono un'associazione tra il livello di ftalati e la comparsa di asma e allergie, soprattutto nei bambini (Ait Bamai et al. 2014). È stato dimostrato inoltre che l'esposizione agli ftalati ha un effetto biologico nell'utero e potrebbe essere associata a una durata della gravidanza più breve (Latini et al. 2003). Anche il bisfenolo-A (BPA) è stato studiato in modo simile agli ftalati e ha dimostrato di essere un tossico per la riproduzione, essendo associato a esiti avversi alla nascita (Peretz et al. 2014) (Blackburn, 2015).

In particolare, per quanto riguarda la placenta, purtroppo non si sa come le MP raggiungano il flusso sanguigno placentare e se provengano dal sistema respiratorio o dal sistema gastrointestinale (Ragusa, 2021.).

Le possibili vie di ingresso e trasporto delle MP dagli organi respiratori e gastrici alla placenta sono rappresentate nella seguente immagine.

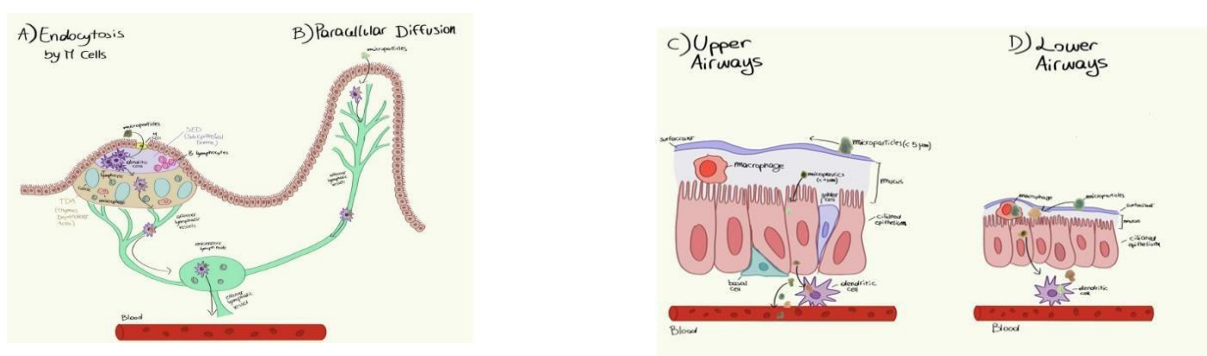


Fig.12 Schema di assorbimento e trasporto delle microplastiche nell'organismo umano. (Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta, A. Ragusa, 2021)

(A) Endocitosi da parte delle cellule M. A livello della chiazza di Peyer, sotto la mucosa intestinale, le MP ingerite con il cibo possono essere assimilate per endocitosi dalle cellule M, trasportate attraverso l'epitelio, saranno in seguito trasportate attraverso la circolazione linfatica, da dove raggiungono il sangue.

(B) Diffusione paracellulare. Le MP potrebbero penetrare attraverso il lume intestinale in corrispondenza delle giunzioni cellulari. Una volta attraversato il lume intestinale, le MP vengono raccolte dalle cellule dendritiche e trasportate nel circolo linfatico e successivamente nella circolazione sistemica.

(C) Vie aeree superiori. A livello delle vie respiratorie superiori il muco è più spesso e consente un'efficace eliminazione delle particelle di corpi estranei, inoltre il movimento meccanico dell'epitelio ciliato e la presenza di tensioattivo impedisce alle particelle più piccole di diffondersi attraverso le vie aeree superiori e raggiungere la circolazione.

(D) Vie aeree inferiori. Nelle vie respiratorie inferiori lo strato di muco è più sottile, facilitando così la diffusione delle particelle che, grazie alla loro particolare forma aerodinamica, riescono ad arrivare in questa parte delle vie respiratorie. Una volta penetrate, le MP possono diffondersi nella circolazione generale mediante assorbimento o diffusione cellulare (Ragusa et al, 2021).

Gli studi relativi all'effetto che queste MP hanno sulla placenta sono ancora da accertare, ma si è vista una notevole correlazione fra esposizione alle MP e gravidanza pretermine.

2.6 AMIANTO

Il termine amianto si riferisce alle sei fasi minerali appartenenti alla classe dei silicati. In particolare, sono cinque inosilicati e un fillosilicato fibrosi, piuttosto ubiquitari nell'ambiente naturale, con caratteristiche fonoassorbenti e resistenti al fuoco. Questi minerali, noti per la loro struttura fibrosa, sono stati ampiamente utilizzati nell'industria già in antichità. Solo negli ultimi anni si è capita la reale tossicità di questi minerali, motivo per cui ne è stato vietato l'uso.

Cinque di queste sei fasi minerarie rientrano nella famiglia degli anfiboli, ovvero degli inosilicati a doppia catena. Le cinque fasi minerali sono:

- Actinolite $\rightarrow \text{Ca}_2(\text{Mg}, \text{Fe}^{2+})_5\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$
- Amosite $\rightarrow (\text{Fe}^{2+}, \text{Mg})_7\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$
- Antofillite $\rightarrow (\text{Mg}, \text{Fe}^{2+})\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$
- Crocidolite $\rightarrow \text{Na}_2\text{Fe}^{2+/3+}(\text{Fe}^{2+}, \text{Mg})_3[\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$

- Tremolite → $\text{Ca}_2\text{Mg}_5\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$
- Crisotilo → $\text{Mg}_3(\text{Si}_2\text{O}_5)(\text{OH})_4$

Invece il sesto minerale appartiene alla famiglia del serpentino (fillosilicato), ed è il crisotilo, il quale ha formula chimica molto simile agli altri due minerali appartenenti ai serpentini, ovvero lizardite e antigorite, ma ha struttura cristallina diversa, ecco perché sono definiti pseudopolimorfi.

Inoltre, il crisotilo corrisponde al 98% delle fasi di amianto reperibili in natura.

Fra tutti questi minerali è noto come la crocidolite sia la più tossica, poiché nella sua struttura chimica c'è un'elevata quantità di ferro, la quale è associata alla maggior probabilità di formazione di cancro.

Ad oggi, sono ben conosciute le patologie asbesto correlate, soprattutto quelle delle vie aeree come il mesotelioma pleurico. Sono attualmente studiate anche le patologie extra respiratorie come il cancro del colon retto o cancro allo stomaco e alla milza, motivo per cui è di interesse indagare sulla possibile contaminazione placentare per vedere se ci possono essere delle eventuali correlazioni fra patologie della gravidanza e presenza di fibre nella placenta.

Difatti, in diversi studi riguardanti la placenta, i feti e le madri hanno prodotto risultati diversi relativi all'esposizione con fibre di amianto. Un'indagine autoptica è stata condotta per esaminare il potenziale trasferimento transplacentare di amianto negli esseri umani (A.K. Haque et al, 1996). Sono stati analizzati i livelli di amianto nei polmoni, nel fegato, nei muscoli scheletrici, di bambini nati morti e nella placenta, con riscontri positivi per la presenza di fibre di amianto, che sono state caratterizzate in base al tipo, tramite microscopia elettronica, analisi a raggi X e diffrazione di aree selezionate. Sono stati rilevati bassi livelli di fibre di amianto, principalmente di dimensioni ridotte e non rivestite. Il conteggio massimo di fibre è stato riscontrato nei polmoni (media 235.400 fibre/g), seguito dal fegato, dalla placenta e dal muscolo scheletrico. Le fibre sono state rilevate in tutte le fasi della gestazione, senza correlazione con l'età gestazionale. È stata osservata un'associazione significativa tra la presenza di fibre e le madri che lavorano, mentre sono state trovate associazioni positive, ma non significative, con altre variabili come l'abuso di droghe da parte materna, e precedenti aborti (Haque et al, 1996).

Non è stata riscontrata alcuna associazione tra la rottura prematura delle membrane e la presenza di fibre. Nei campioni di controllo dei neonati nati vivi non sono state rilevate fibre di amianto. È stata evidenziata una differenza altamente significativa nel conteggio delle

fibre di amianto tra i neonati nati morti e quelli nati vivi. Questi risultati supportano la presenza di fibre di amianto nei neonati nati morti, con un'associazione positiva con le madri che lavorano (Haque et al, 1996).

2.7 METALLI PESANTI

Metalli pesanti è un termine ampiamente utilizzato per descrivere un gruppo di elementi metallici presenti in natura con peso molecolare e densità elevati rispetto all'acqua, in particolare si intendono tutti quei metalli con densità maggiore di 4,5 grammi al centimetro cubo.

A basse concentrazioni, alcuni metalli pesanti, come ferro, zinco, rame e manganese, sono essenziali per la sopravvivenza umana ma possono diventare agenti tossici a concentrazioni più elevate. Altri metalli pesanti, come l'arsenico, il cadmio, il piombo, il tallio e il mercurio, non svolgono alcun ruolo biologico. Tuttavia, entrano inevitabilmente nel corpo umano a causa della loro presenza nell'ambiente. Analogamente ai metalli essenziali, indurranno tossicità una volta raggiunte determinate concentrazioni (Fisher et al 2020).

I metalli pesanti possono attraversare la barriera placentare e raggiungere il feto, minacciandone lo sviluppo. Le donne incinte possono essere esposte ad essi attraverso il cibo, l'acqua potabile, abitudini potenzialmente tossiche o semplicemente respirando aria inquinata. La placenta è stata descritta come un biomarcatore dell'esposizione materna e fetale a diversi elementi tossici (Molina-Mesa et al, 2022).

Diversi metalli pesanti tossici come piombo, cadmio, arsenico e mercurio sono fattori favorevoli le nascite pretermine in tutto il mondo. Studi recenti hanno indicato che questi metalli pesanti inducono stress ossidativo nel tessuto placentare trofoblastico producendo specie reattive dell'ossigeno che alterano il meccanismo degli antiossidanti che potrebbero portare alla nascita pretermine. Attualmente, però, ci sono ancora pochi dati su questa probabile correlazione, motivo per cui sarebbe bene approfondire questo tipo di studio (Laxmi Singh et al, 2018).

In particolare, attraverso diversi studi, si è riscontrato come il piombo sia il metallo pesante che maggiormente si ritrova anche nel sangue fetale e non solo in quello materno. Per questo motivo si deduce che la placenta possa essere una barriera inefficace contro alcuni elementi tossici (Enas R. Abdel Hameed, et al 2019).

3. MATERIALI E METODI

In questo capitolo saranno elencate le diverse metodologie con le quali è stato possibile ottenere i campioni da analizzare, ovvero campioni di placenta, porzione deciduale e porzione fetale, di donne sane, le quali hanno partorito con gravidanza a termine nel presidio ospedaliero “S. Spirito” di Casale Monferrato (AL). Le diverse analisi sono state eseguite in seguito a digestione chimica, oppure direttamente su sezione istologica. Le tecniche che si sono valutate per la fattibilità della ricerca delle particelle estranee nella placenta sono:

- Microscopia ottica, per valutare eventuali lesioni istologiche elementari e la presenza di particelle estranee al campione.
- Microscopia elettronica a scansione (SEM); per indagare la natura morfologica e chimica delle eventuali particelle estranee ritrovate.
- Spettroscopia micro-Raman, per confermare l'identità della/e particella/e individuate.

3.1. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER MICROSCOPIA OTTICA

Il tessuto placentare è stato fornito dal Servizio di Anatomia Patologica dell'ospedale S. Spirito di Casale Monferrato (AL) in blocchi inclusi in paraffina.

I materiali impiegati per la preparazione dei vetrini sono stati:

- Attrezzatura da taglio (bisturi, lamette, forbici chirurgiche);
- Pinzette;
- Pennellini;
- Microtomo;
- Biocassette da inclusione;
- Contenitori in plastica con tappo a vite;
- Acqua MilliQ deionizzata;
- Etanolo in diverse concentrazioni (70%,95%,100%);

- Ematossilina di Mayer;
- Eosina;
- BioClear.

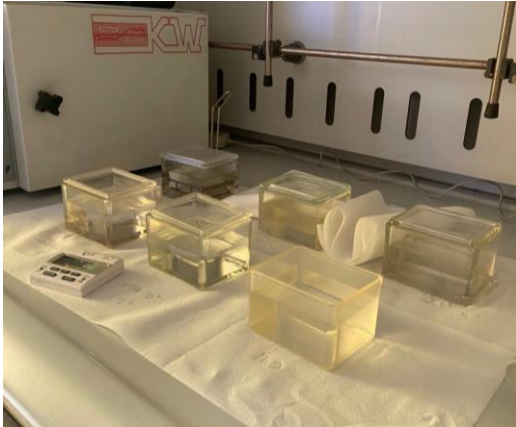


Fig.13 A sinistra contenitori con bioClear, Etanolo a diverse concentrazioni e acqua; a destra contenitori per colorazione con Ematossilina e Eosina, inoltre è presente la stufa sulla quale si lasciavano asciugare i vetrini con sopra le sezioni, prima della colorazione.

Il primo passaggio da eseguire è la rimozione dell'eccesso di paraffina dalla sezione, attraverso l'impiego di lamette o bisturi. In seguito, si inserisce la biocassetta contenente la sezione, nell'apposito supporto del microtomo e con esso si tagliano delle sezioni spesse circa 5 μm .



Fig.14 Microtomo con campione incluso in paraffina situato nell'apposito supporto.

Successivamente, con l'ausilio di un pennellino, si sollevano le sezioni tagliate per poi posizionarle su un vetrino portaoggetti, sul quale era stata depositata precedentemente dell'acqua MilliQ a temperatura ambiente. I vetrini vengono poi riscaldati su una piastra apposta a 40-45 °C e l'eccesso di acqua viene eliminato mediante l'utilizzo di carta assorbente. Una volta asciutti, i vetrini, sono stati colorati con la tecnica Ematossilina-Eosina (E-E). La colorazione E-E è la più comune colorazione istologica, utilizzata prevalentemente nel campo della microscopia ottica. Questo tipo di colorazione consente di osservare, in chiave prettamente morfologica, i diversi tessuti organici in analisi, ed è alla base degli esami istopatologici. L'utilizzo dei due coloranti diversi tra loro consente di evidenziare differientemente i costituenti di una cellula; infatti, l'ematossilina consente di evidenziare i nuclei delle cellule, mentre l'eosina colora le componenti citoplasmatiche. Inoltre, la colorazione dipende dal valore di pH delle diverse zone cellulari. (<https://www.microbiologiaitalia.it/microscopia/colorazione-ematossilina-eosina/>)

La colorazione avviene secondo un protocollo di laboratorio standardizzato:

- 1) Eliminazione della paraffina, immergendo il campione 2 volte per 30s nel BioClear;
- 2) Reidratazione in etanolo a concentrazioni decrescenti:
 - 100%
 - 95%
 - 70%
- 3) Immersione in acqua corrente;
- 4) Colorazione:
 - Ematossilina di Mayer filtrato per 20 min;
 - Lavaggio in acqua corrente;
 - Eosina per 4 minuti;
 - Disidratazione in etanolo a concentrazioni crescenti:
 - i. 70% per 5 min;
 - ii. 95% per 5 min;
 - iii. 100% per 5 min;

- Chiarificazione in Bioclear 3 volte per 30s;
- Montaggio con Eukitt e vetrino copri oggetto.

Le sezioni bianche, dopo il taglio, vengono direttamente montate sul vetrino o su un tondino di plastica per l'analisi in spettroscopia micro-Raman e SEM/EDS.

Una volta ottenuto il vetrino con la sezione colorata, si può procedere all'osservazione mediante l'utilizzo di microscopio ottico.

3.2 MICROSCOPIA OTTICA

I vetrini colorati con E-E sono stati sottoposti dapprima all'analisi in microscopia. Il vetrino è stato osservato per intero, in modo da esaminare tutta la porzione tissutale ed extratissutale (eventuale presenza di materiale nella paraffina).

Nel corso delle osservazioni si annotavano le coordinate delle eventuali formazioni di interesse per i risultati, e fotografate.

3.2.1 FUNZIONAMENTO MICROSCOPIO OTTICO A LUCE TRASMESSA E POLARIZZATA

Molti organismi e anche il materiale inorganico sono generalmente più piccoli di quello che noi possiamo vedere ad occhio nudo. La lente d'ingrandimento consente l'aumento delle dimensioni dell'immagine di un oggetto osservato, a seconda del suo potere d'ingrandimento. Utilizzando due lenti, l'immagine ingrandita dalla prima lente può essere ulteriormente ingrandita dalla seconda. Questo rappresenta il principio di funzionamento del microscopio ottico (www.istitutomedici.edu.it).

Il microscopio ottico è costituito da due sistemi di lenti inserite in un tubo ottico: l'oculare, in cui si guarda, e l'obiettivo, situato in prossimità dell'oggetto da osservare. Nel microscopio ottico gli oggetti da osservare devono essere attraversati dalla luce. La distanza minima al di sotto della quale non è possibile percepire due punti tra loro distanti è detto potere di

risoluzione, che nel microscopio ottico è di 400 volte superiore a quello dell'occhio umano.
(www.istitutomedici.edu.it)

Oltre al sistema ottico, il microscopio possiede un sistema di illuminazione e una struttura di sostegno detto stativo, che comprende la base di appoggio, il tavolino portaoggetti e un supporto a cui è collegato il tubo portalenti. Il sistema di illuminazione può essere costituito anche solo da uno specchio, situato sotto l'oggetto da osservare. Lo specchio (orientato adeguatamente) riflette sull'oggetto una luce. Il sistema di illuminazione può comprendere anche un condensatore, che concentra la luce sull'oggetto, e un diaframma, che regola la quantità di luce riflessa. L'oggetto da osservare viene attraversato dalla luce proveniente dallo specchio e la sua immagine viene poi ingrandita dal sistema ottico: ciò è possibile solo se l'oggetto è trasparente o viene ridotto a sezioni sottilissime (utilizzando il microtomo). Per evidenziare meglio i particolari, l'oggetto può essere colorato con coloranti opportunamente scelti. L'oggetto viene posto su un vetrino portaoggetti e coperto da un vetrino coprioggetto. Se si deve conservare il vetrino a lungo, occorre anche un trattamento di fissaggio. Il vetrino così preparato viene appoggiato sul tavolino portaoggetti, che ha un foro che consente il passaggio della luce proveniente dallo specchio. La luce così raggiunge il vetrino (fissato sul tavolino per mezzo delle molle fermavetrino) e illumina l'oggetto dal basso verso l'alto. La struttura di sostegno del microscopio, detta stativo, Sul supporto troviamo la vite macrometrica, che può avvicinare o allontanare il tubo portalenti al vetrino per mettere a fuoco l'oggetto e ottenere una immagine nitida; la vite micrometrica, infine, consente movimenti più fini, più piccoli per migliorare la messa a fuoco (Zanichelli.it).

Quindi si può generalmente dire che il microscopio è costituito da una parte meccanica e una parte ottica:

La parte meccanica è composta da:

- uno stativo, che costituisce un sostegno centrale metallico su cui sono inseriti gli altri pezzi; lo stativo poggia su una pesante base;
- un tavolino porta oggetti, con apertura al centro per consentire alla luce di passare e attraversare il vetrino;
- il tubo ottico, in cui sono inseriti i due sistemi di lenti (oculare e obiettivo);

La messa a fuoco dell'immagine viene effettuata mediante:

- una vite macrometrica, che consente gli spostamenti verticali del tubo ottico;

- una vite micrometrica, che consente solo minimi movimenti verticali del tubo ottico. La parte ottica è costituita da:

- 2 sistemi di lenti, obiettivo e oculare; l'obiettivo è inserito nella parte più bassa del tubo ottico, in prossimità del preparato; l'oculare è alla sommità del tubo ottico; i microscopi ottici possono essere dotati di 1 o 2 oculari (si diranno per questo monoculari o binoculari); possono poi essere presenti vari obiettivi, inseriti in un supporto a revolver, che può essere ruotato (si usa un obiettivo per volta);

- apparato di illuminazione, può essere costituito da una semplice lampada inserita direttamente alla base, o da uno specchietto a due facce, orientabile, per convogliare i raggi luminosi verso il preparato da osservare. Il preparato da osservare deve essere sottile per poter essere attraversato dalla luce e quindi osservato;

- un condensatore di luce, regolabile in altezza, che concentra la luce sul preparato;

- un diaframma ad iride (tra condensatore e fonte luminosa), che regola l'intensità di luce a seconda delle esigenze;

- un'eventuale lente che funge da filtro.

Gli obiettivi possono avere diverso potere di ingrandimento, per esempio: 4x, 10x, 40x, 100x. La capacità di ingrandimento di un microscopio dipende dai sistemi di lenti impiegati e si ottiene moltiplicando il potere di ingrandimento dell'obiettivo per quello dell'oculare. Es.: oculare 10x e obiettivo 40x = potere di ingrandimento 400x (questo significa che le dimensioni reali dell'oggetto appariranno ingrandite di 400 volte).

(www.istitutomedici.edu.it)

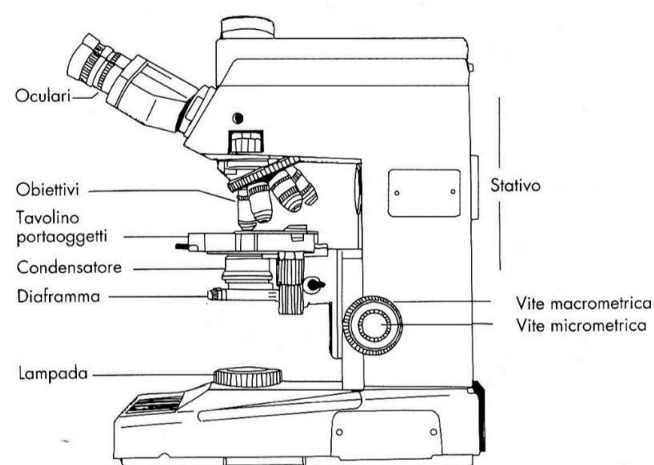


Fig.15 Microscopio ottico a luce trasmessa (www.istitutomedici.edu.it).

Il microscopio a luce polarizzata invece, è progettato per osservare campioni o particelle che sono visibili soprattutto a causa del loro carattere otticamente anisotropo. Al fine di svolgere tale compito, il microscopio deve essere dotato di due filtri: un polarizzatore, posizionato nel percorso della luce prima del campione e un analizzatore (secondo polarizzatore), posto nel percorso ottico tra il diaframma dell'obiettivo posteriore e il tubo di osservazione o la fotocamera. È bene ricordare che i due filtri, ruotati di 90° l'uno rispetto all'altro, non lasciano passare luce quando sono disposti di seguito nel percorso ottico. Generalmente il polarizzatore è posizionato nel condensatore, l'analizzatore sopra l'obiettivo ed ha un'angolazione di 90° rispetto al polarizzatore, questa angolazione può essere modificata nei dispositivi che hanno possibilità di ruotare il filtro analizzatore. Il contrasto dell'immagine nasce dall'interazione della luce polarizzata con un soggetto birifrangente che porterà alla formazione di due lunghezze d'onda individuali, entrambe polarizzate, in piani perpendicolari tra loro. La velocità di queste onde è diversa e varia a seconda della direzione di propagazione attraverso il campione. Dopo l'uscita dal campione, le onde sono "fuori fase", ma si ricombinano con un'interferenza costruttiva e distruttiva quando passano attraverso l'analizzatore. I campioni appariranno più luminosi su uno sfondo scuro. I colori possono cambiare quando i filtri sono ruotati. Se sul tavolino del microscopio non c'è un preparato o c'è solo un vetrino portaoggetti vuoto e pulito, l'immagine sarà completamente scura, dato che l'analizzatore non consente il passaggio della luce che ha una polarizzazione ortogonale al proprio asse.

Un altro componente del microscopio a luce polarizzata è la lamina lambda, questa lamina converte il contrasto in colori sfruttando le differenze di fase nella lamina stessa, il risultato è l'estinzione di determinate lunghezze d'onda della luce, quelle che rimangono sono solo relative a determinati colori, il risultato è la formazione di immagini colorate che possono quindi essere identificate in base ai colori (<http://www.fluorescencemicroscopy.it>).

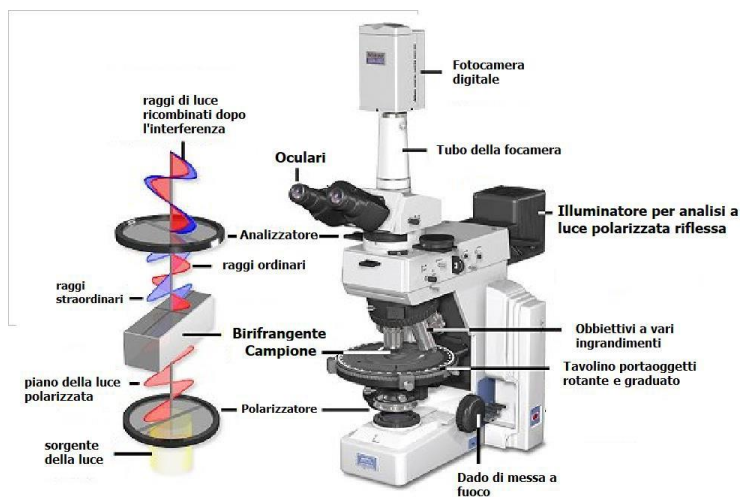


Fig.16 Microscopio ottico a luce polarizzata
(<https://manualedelgeologo.it>).

3.3 MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE

La microscopia elettronica a scansione con annessa microsonda in dispersione di energia (SEM/EDS) è un tipo di microscopia che sfrutta elevati ingrandimenti (fino a 200.000x teorici) ed alta risoluzione (limite 2 nm) che consente di ottenere gli spettri relativi alla composizione chimica dei materiali. Il SEM è uno strumento molto versatile poiché consente l'analisi di un'ampia varietà di campioni, che differiscono per natura, forma e dimensione. Per poter osservare attraverso questo strumento il nostro campione di interesse, è prima necessario che sia preparato, in quanto arriva dall'ospedale in provette, conservato in formalina. Se si tratta di campioni organici è richiesta una digestione chimica affinché si possano osservare eventuali componenti inorganiche presenti.

La digestione prevede i seguenti passaggi:

- Pesare il campione intero utilizzando bilancia tecnica e riportare i dati sul quaderno di laboratorio;
- Prelevare circa 0,25 g di tessuto, sminuzzandolo attraverso l'uso di lamette e bisturi;
- Pesare con bilancia tecnica lavorando con un errore di $d = 1 \times 10^{-2}$ g;

La componente organica viene rimossa attraverso la digestione con 10 ml di NaClO riscaldando la soluzione a circa 40°C. Questa procedura è necessaria per il passaggio successivo ovvero la filtrazione dopo 72 ore circa.



Fig.17 Nell'immagine di destra si osserva la bilancia tecnica per la pesatura del campione, a destra provetta Falcon e NaCl per la digestione.

Filtrazione del campione digerito:

- Filtrazione su un filtro misto in policarbonato con diametro 25 mm e porosità di 0,2 μm al fine di raccogliere il materiale inorganico;
- La soluzione è stata diluita con acqua MilliQ riscaldata a 60°C per ridurre la precipitazione di materiale estraneo in particolar modo NaCl;
- I filtri sono stati analizzati usando un microscopio elettronico a scansione SEM Cambridge S-360 con detector per elettroni secondari (SE) e retrodiffusi (BSE), dotato di una microsonda a dispersione di energia Oxford INCA Energy 200, detector EDS pentafet (SATW) con le seguenti condizioni sperimentali: pressione di 90 Pa, distanza di lavoro di 10 mm e tensione di accelerazione di 20 kV.
- Al termine della filtrazione la membrana è stata “sciacquata” con acqua microfiltrata calda per la dissoluzione dei microcristalli di NaCl formati durante la digestione.
- Il filtro asciutto è stato fatto aderire su apposito supporto con nastro biadesivo e successivamente metallizzato con grafite.

Sono stati analizzati 650 campi microscopici, corrispondenti a circa 12 mm², con un ingrandimento di 2000 \times . I campi microscopici vengono visualizzati lungo sei strisce orizzontali parallele e la distanza tra le strisce orizzontali è stata precedentemente definita per evitare la sovrapposizione tra le aree esaminate. Le immagini retrodiffuse, caratterizzate dal contrasto in bianco/nero prodotto da materiale inorganico, hanno consentito la rilevazione delle fasi inorganiche. Gli spettri EDS sono stati elaborati utilizzando il software INCA.



Fig.18 Nell'immagine a sinistra si osserva il sistema filtrante, a destra il filtro di policarbonato.

3.3.1 FUNZIONAMENTO DELLO STRUMENTO

La tecnica trova applicazione in molti settori, tra cui biologia, chimica e discipline legate ai beni culturali.

Nonostante i numerosi vantaggi, la microscopia elettronica a scansione presenta alcune limitazioni: non permette analisi *in situ*, non consente caratterizzazioni cristallografiche, e richiede un database di spettri di riferimento per l'identificazione delle fasi. Inoltre, la natura del campione può influenzare significativamente l'accuratezza dell'analisi.

Esistono tre modalità di lavoro in cui il SEM può operare:

1. Alto vuoto (HV): $P < 0$ Pa su campioni conduttivi metallizzati e secchi;
2. Basso vuoto (LV): $P < 130$ Pa= 1 Torr su campioni secchi ma poco o non conduttivi;
3. Enviromental – SEM (ESEM): in condizioni estreme di basso vuoto fino alla pressione ambientale ($130 \text{ Pa} < P < 1000 \text{ Pa} = 8 \text{ Torr}$), su campioni non conduttivi ed umidi.

I microscopi elettronici a scansione sono formati da:

- una sorgente di elettroni;
- un anodo verso cui sono accelerati gli elettroni;
- lenti elettromagnetiche che servono a focalizzare il fascio di elettroni;
- una lente di scansione e di messa a fuoco del preparato, ove il fascio elettronico interagisce con il campione;
- una camera da vuoto con tavolino porta-campioni (stage) per posizionare il campione;
- diversi tipi di rivelatori che acquisiscono i segnali generati dall'interazione tra il fascio elettronico e il campione e li trasmettono a dispositivi di elaborazione;
- uno schermo su cui l'immagine viene ricostruita e visualizzata.



Fig.19 SEM presente presso l'Università di Torino
 (https://chimica.campusnet.unito.it/do/aule.pl/Show?_id=92ee).

Nella parte superiore della colonna si trova la "sorgente di elettroni", solitamente costituita da un filamento in tungsteno o da esaboruro di lantanio, che agisce come catodo. Questo catodo viene riscaldato fino a circa 2700K, emettendo elettroni tramite effetto termoionico. Un'alternativa è una sorgente ad emissione di campo (FEG), che consente di ottenere elevate prestazioni strumentali.

Il filamento è posizionato all'interno di un cilindro perforato e polarizzato chiamato Wehnelt, che ha il compito di selezionare un fascio di elettroni. La tensione di alimentazione del Wehnelt può essere variata e la sua polarizzazione può essere più o meno negativa rispetto al fascio di elettroni.

Al di sotto del cilindro si trova un anodo, che accelera gli elettroni emessi dal filamento a energie variabili, generalmente comprese tra 0,3 e 30 keV. Sebbene gli elettroni vengano emessi dal filamento in tutte le direzioni, il campo elettrico del Wehnelt e la differenza di potenziale tra quest'ultimo e l'anodo li convogliano in una regione nota come "cross over", dove si forma l'immagine della sorgente.

Sotto l'anodo, nella colonna del microscopio, sono presenti tre lenti elettromagnetiche. Le prime due servono a collimare e regolare la larghezza del fascio di elettroni, mentre la terza mette a fuoco il campione alla distanza di lavoro scelta dall'operatore. Quando il fascio elettronico attraversa queste lenti, possono verificarsi quattro tipi di aberrazioni che l'operatore può correggere durante l'analisi:

1. Aberrazione sferica, che si manifesta quando gli elettroni che viaggiano a distanze diverse dall'asse vengono focalizzati in punti differenti.
2. Aberrazione cromatica, che si verifica quando elettroni con diverse energie vengono focalizzati su piani diversi a causa della velocità non uniforme del fascio.
3. Aberrazione di diffrazione, causata dal fatto che non tutte le onde raggiungono l'interno della lente a causa delle dimensioni finite della lente e della natura non ondulatoria dell'elettrone.
4. Astigmatismo, che si verifica quando fattori come contaminazioni o irregolarità nella fabbricazione delle bobine inducono asimmetrie nel campo delle lenti.

Riducendo l'angolo di divergenza tra il fascio elettronico e il campione (lunghezza focale), è possibile correggere sia le aberrazioni cromatiche che quelle sferiche. Un compromesso per ottenere le migliori condizioni operative consiste nel ridurre la lunghezza focale delle lenti senza portare il campione all'interno del loro campo magnetico.

La scansione viene effettuata tramite l'uso di due coppie di bobine posizionate vicino all'asse ottico. I campioni sono collocati nella camera porta campioni, che contiene tavolini (stage) che permettono di muovere il campione nelle tre direzioni dello spazio, oltre a ruotarlo e

inclinarlo. I campioni sono fissati su supporti chiamati "pin stub", progettati con una forma specifica per inserirli nei fori del piattello porta campioni all'interno della camera dedicata.

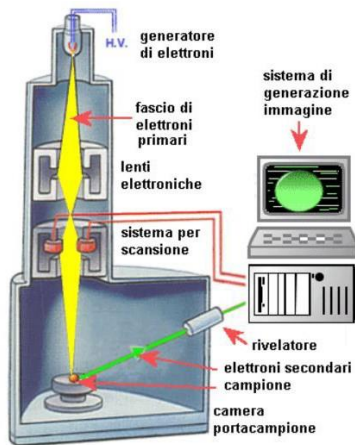


Fig.20 A sinistra, schema di funzionamento SEM (www.microbiologiaitalia.it/microscopia/il-microscopio-elettronico/); a destra, sostegno pin stub.

Il fascio di elettroni generato dal filamento, collimato e regolato dalle lenti elettromagnetiche, raggiunge il campione effettuando una scansione riga per riga. L'interazione tra gli elettroni e il campione produce una serie di segnali che forniscono informazioni morfologiche e composizionali. Diversamente dalla microscopia ottica, che produce un'immagine reale, il SEM crea un'immagine virtuale basata sui segnali emessi dall'interazione con il fascio elettronico primario.

Quando gli elettroni emessi dalla sorgente interagiscono con il campione, generano vari fenomeni fisici:

- **Elettroni retrodiffusi:** si verificano quando gli elettroni del fascio rimbalzano elasticamente dai nuclei degli atomi del campione. Questi elettroni provengono da strati profondi e hanno un'energia compresa tra 50 eV e l'energia di incidenza del fascio elettronico primario. Forniscono sia informazioni composizionali che morfologiche.
- **Elettroni secondari:** si producono quando gli elettroni del fascio espellono elettroni dagli orbitali esterni degli atomi del campione. Provengono dagli strati più superficiali del campione, circa 10 nm, e hanno un'energia di penetrazione bassa, fino a 50 eV. Forniscono informazioni morfologiche sulla superficie del campione.
- **Raggi X:** vengono emessi quando un elettrone del fascio espelle uno degli elettroni degli strati più interni dell'atomo, ionizzandolo. Un elettrone di un livello superiore

può quindi riempire il posto vacante, emettendo un fotone X con energia pari alla differenza tra i due livelli. I raggi X vengono rilevati da rivelatori EDS o WDS, fornendo informazioni composizionali sia qualitative che quantitative. (Rinaudo e Croce, 2020).

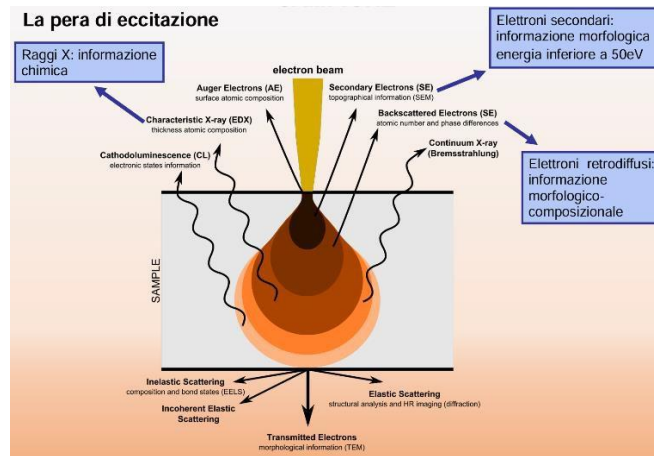


Fig.21 Schema della pera di eccitazione, (Croce, 2022, da <https://www.dir.uniupo.it/course/view.php?id=18130>).

Per ciascuno dei tre tipi di segnali esistono rivelatori dedicati all'interno della camera porta campioni:

- **Rivelatore degli elettroni secondari:** Opera a una tensione elevata di 10 kV ed è posizionato a basso angolo per attirare gli elettroni secondari, che hanno bassa energia. L'immagine in scala di grigi che produce fornisce informazioni sulla tridimensionalità morfologica della porzione di campione analizzata.
- **Rivelatore degli elettroni retrodiffusi:** È posizionato sopra il campione. Gli elettroni retrodiffusi, con un'energia che va da 50 eV fino all'energia del fascio, sono più energetici rispetto agli elettroni secondari. Il contrasto delle tonalità di grigio evidenzia la diversa composizione chimica delle varie parti del campione, con le aree di materiali a peso atomico maggiore risultando più chiare rispetto a quelle con materiali a peso atomico minore.
- **Rivelatore di dispersione di energia (EDS):** Fornisce informazioni chimiche sotto forma di raggi X. Consente di eseguire analisi puntuali (mettendo il fascio in pausa), analisi lineari, areali e la creazione di mappe a colori che mostrano la distribuzione degli elementi nell'area analizzata. Il segnale dei raggi X è caratteristico dell'atomo e permette la sua identificazione.

Ogni tipo di interazione viene convertito in un segnale digitale e visualizzato sullo schermo del computer. Software dedicati permettono di ottenere dati chimici e mappe a raggi X, sia qualitativi che quantitativi.

3.4 SPETTROSCOPIA MICRO-RAMAN

Nel 1928, il fisico indiano C. V. Raman osservò che, quando un materiale viene colpito da un fascio di radiazioni monocromatiche, una piccola parte della radiazione diffusa presenta una lunghezza d'onda diversa rispetto a quella della radiazione incidente. La radiazione diffusa si compone di tre tipi distinti:

- **Diffusione Rayleigh:** Caratterizzata dalla stessa lunghezza d'onda della radiazione incidente, è molto intensa.
- **Righe Stokes:** Presentano lunghezze d'onda inferiori rispetto alla radiazione incidente.
- **Righe anti-Stokes:** Presentano lunghezze d'onda superiori rispetto alla radiazione incidente (Rinaudo e Croce, 2022)

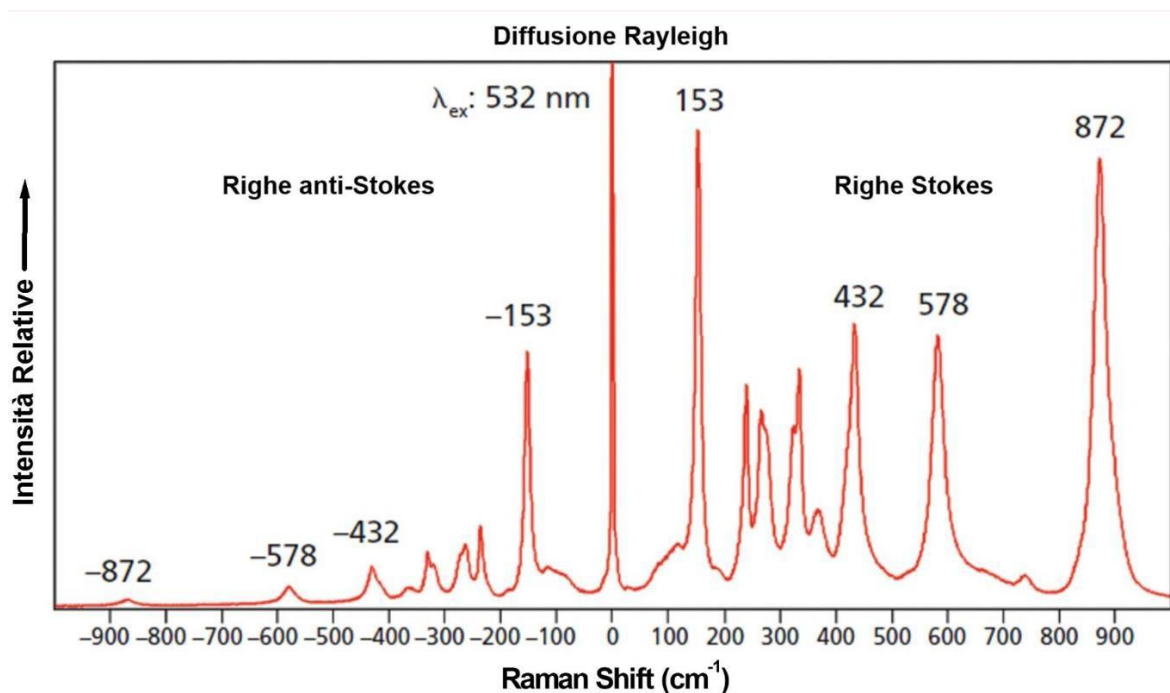


Fig.22 spettro Raman (Rinaudo e Croce, 2022).

Raman aveva notato che la frequenza delle bande Stokes e anti-Stokes non dipendeva dalla lunghezza d'onda della sorgente eccitatrice, ma era determinata esclusivamente dalle vibrazioni dei legami chimici del composto in esame. Questo rende lo spettro Raman una vera e propria "impronta digitale" del campione analizzato.

L'effetto Raman è associato a una proprietà chiamata polarizzabilità di legame, indicata con α , che misura quanto facilmente il legame può essere deformato da un campo elettrico. Quando una molecola interagisce con un campo elettrico, si genera un momento di dipolo: $\mu = \alpha E$. Questo momento di dipolo emette una radiazione alla stessa frequenza della radiazione incidente, producendo la diffusione Rayleigh. Inoltre, si generano due serie di radiazioni a frequenze maggiori e minori, dovute alle variazioni della polarizzabilità della molecola causate da alcune rotazioni o vibrazioni della stessa.

Per comprendere l'origine del fenomeno fisico legato all'effetto Raman, consideriamo che a temperatura ambiente le molecole occupano uno dei livelli energetici del loro stato elettronico fondamentale, seguendo i principi della distribuzione di Boltzmann. Quando una molecola entra in contatto con un fotone proveniente dalla fonte di eccitazione, l'energia portata dal fotone ($E = h\nu_0$) induce una transizione energetica, ovvero la molecola si sposta temporaneamente verso uno dei molteplici "stati virtuali" situati tra il suo stato elettronico fondamentale e il primo stato eccitato.

Ci sono diverse situazioni possibili:

1. Una molecola inizialmente nello stato elettronico fondamentale viene temporaneamente eccitata dalla radiazione incidente e poi ritorna al suo stato iniziale, emettendo un fotone con energia uguale a quella del fotone incidente. In questo caso, non vi è una variazione netta di energia ($\Delta E = 0$). Questa è la situazione più probabile e costituisce la componente predominante nella luce diffusa. Nello spettro Raman, questa situazione produce la banda più intensa, situata all'origine degli assi (diffusione Rayleigh).
2. L'energia della molecola subisce una variazione ΔE , che può essere sia positiva che negativa:
 - Se la molecola inizialmente è nello stato fondamentale e viene irradiata dal fascio incidente, temporaneamente sale a un livello eccitato per poi decadere verso il suo stato fondamentale, fermandosi leggermente al di sotto del punto

di partenza. In questo caso, la molecola aumenta la propria energia ($h\nu_0 - \Delta E$), dando origine alle bande Stokes.

- Se la molecola si trova già in uno stato energetico superiore rispetto a quello fondamentale e viene colpita dalla radiazione incidente, temporaneamente sale a uno stato eccitato per poi ritornare allo stato fondamentale, diminuendo la propria energia ($h\nu_0 + \Delta E$). Questo fenomeno dà origine alle bande anti-Stokes.

Nella diffusione di Rayleigh, non avviene emissione di energia; la collisione tra una molecola e il fotone della radiazione incidente è di tipo elastico. Al contrario, le diffusioni di Stokes e anti-Stokes si differenziano dalla Rayleigh di una quantità $\pm \Delta E$ e sono considerate "anelastiche".

Quando una radiazione con energia $h\nu_0$ colpisce un campione, la radiazione diffusa dal campione genera uno spettro Raman. Questo spettro presenta una banda principale, che rappresenta la diffusione Rayleigh più probabile ($\Delta\nu = \nu - \nu_0 = 0$) e di massima intensità. Insieme, compaiono due serie di righe secondarie, disposte simmetricamente rispetto alla riga principale: le righe Stokes ($\Delta\nu < 0$, quando $\nu < \nu_0$) e le righe anti-Stokes ($\Delta\nu > 0$, quando $\nu > \nu_0$).

Lo spettro Raman appare come una serie di bande risultanti dai vari modi di vibrazione dei gruppi presenti nel campione sotto esame. Sull'asse delle ascisse dello spettro Raman viene indicato lo spostamento in numeri d'onda, $\nu = 1/\lambda$, mentre sull'asse delle ordinate si rappresenta l'intensità delle bande in unità Raman. È importante notare che le unità Raman sono relative e non assolute; pertanto, non possono essere utilizzate per confrontare direttamente spettri diversi.

Le vibrazioni possono essere di: stretching simmetrico, stretching asimmetrico oppure di bending. I modi di bending possono essere:

- scissoring (a forbice nel piano);
- rocking (oscillazione nel piano);
- wagging (ondeggio fuori del piano);
- twisting (torsione fuori dal piano).

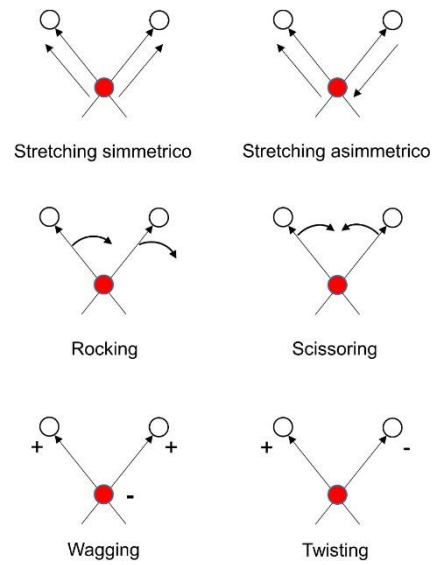


Fig.23 Moti di stretching e bending (Croce, 2022)

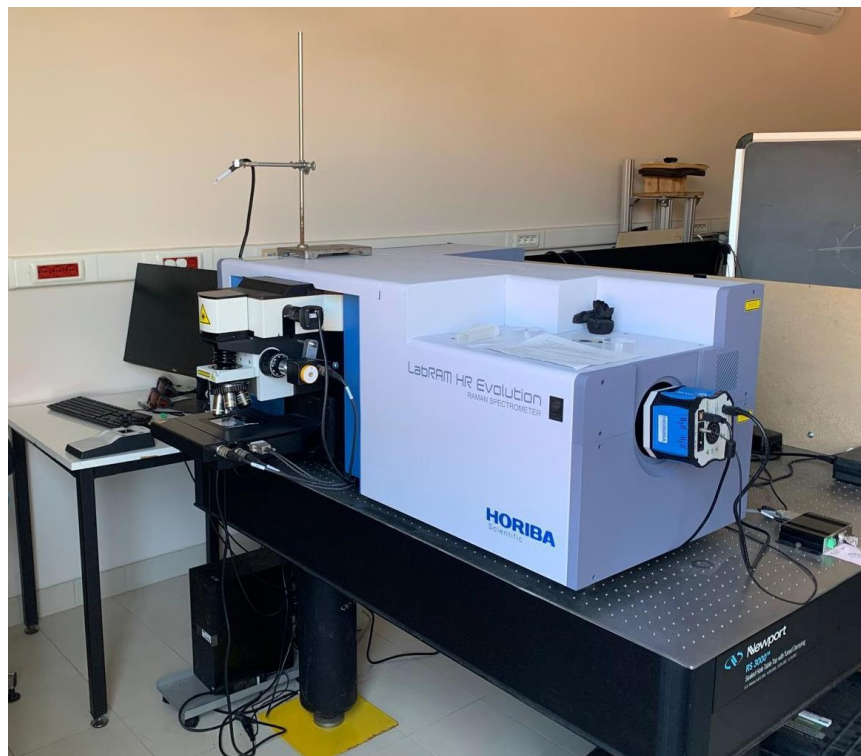


Fig.24 Spettroscopio micro-Raman al polo DISIT di Alessandria

I vantaggi dell'uso della spettroscopia micro-Raman includono:

1. **Risoluzione spaziale elevata.** La possibilità di combinare lo spettroscopio Raman con un microscopio ottico consente una risoluzione spaziale elevata, permettendo di analizzare specifiche aree di un campione con dettaglio anche a livello microscopico.
2. **Analisi non distruttiva.** La spettroscopia micro-Raman non richiede una preparazione elaborata del campione e non lo danneggia durante l'analisi, consentendo così ulteriori indagini su campioni già analizzati.
3. **Analisi di campioni eterogenei.** Permette l'identificazione dell'eterogeneità sia a livello compositivo che strutturale all'interno di un campione. La capacità di mirare il raggio laser su aree specifiche consente di ottenere informazioni dettagliate su diverse parti del campione.
4. **Versatilità di analisi dei campioni.** È possibile analizzare campioni in vari stati, inclusi solidi (cristallini e amorfi), liquidi e gassosi, offrendo una vasta gamma di applicazioni in diversi settori scientifici e industriali.
5. **Sensibilità e precisione.** È in grado di individuare sostanze anche a concentrazioni molto basse, fornendo dati affidabili e dettagliati sulla composizione chimica e strutturale del campione.
6. **Analisi in tempo reale.** Le analisi possono essere eseguite in tempo reale, consentendo una rapida acquisizione e interpretazione dei dati.
7. **Compatibilità con altre tecniche.** Può essere utilizzata in combinazione con altre tecniche analitiche, come la microscopia elettronica a scansione (SEM) o la microscopia ottica, per ottenere una visione più completa e approfondita del campione.

Tuttavia, un limite da considerare è la possibile interferenza della fluorescenza, che può coprire una parte significativa dello spettro, rendendo difficile l'identificazione delle bande Raman. Per superare questo limite, è possibile utilizzare una radiazione incidente con una lunghezza d'onda maggiore: la minore energia associata a questo raggio laser permette di enfatizzare l'effetto Raman, anche se con una minore intensità, riducendo significativamente l'interferenza.

I campioni del nostro studio, sono stati sottoposti ad analisi Raman, sia a fresco, previa analisi e identificazione dello spettro della formalina, sia quando erano già allestiti su vetrino.

L'identificazione dello spettro della formalina è stata fondamentale per accertarsi che gli spettri ottenuti dalle successive analisi fossero legati esclusivamente a ciò che era presente nel campione e non soggetto quindi ad errori.

Per l'analisi dei vetrini invece è stato fondamentale settare lo strumento in modo tale da escludere il vetrino coprioggetto dall'analisi. Questo è stato possibile grazie alla valutazione e ricerca della corretta hall confocale.

4. RISULTATI

In questo studio, si è voluto valutare l'applicabilità delle tre tecniche sopra descritte per ricercare la presenza di diverse particelle inquinanti in esame, fra cui eventuali microplastiche, metalli pesanti o fibre di amianto.

Per effettuare tale analisi si è preso in esame un caso, che è stato sottoposto ad analisi mediante le tre diverse tecniche.

La prima tecnica presa in analisi è stata la microscopia ottica, con la quale si può evidenziare la presenza o assenza di particelle non appartenenti al campione, e inoltre si può constatare se il campione è sano o presenta aree di natura patologica, eventualmente correlata alla presenza del materiale estraneo.

La microscopia elettronica a scansione viene poi applicata per analizzare la natura chimica delle particelle inquinanti eventualmente identificate.

Per un'ulteriore conferma e riconoscimento, è stata poi eseguita analisi a spettroscopia micro-Raman, che consente di accertare ancora più nel dettaglio ciò che precedentemente si è individuato.

4.1 ANALISI AL MICROSCOPIO OTTICO:

L'analisi è stata effettuata su sezioni ottenute attraverso taglio al microtomo del blocchetto in paraffina del tessuto in esame, incluso dopo fissazione in formalina al 10%. In seguito, le sezioni ottenute sono state colorate con ematossilina ed eosina ed osservate al microscopio. Dei vari vetrini ottenuti, si è tenuto traccia di quelli nei quali sono stati evidenziati elementi ritenuti importanti per la nostra analisi. Segue nei paragrafi successivi, la spiegazione di ciò che è stato osservato microscopicamente.

Degli 8 vetrini ottenuti dal caso, sono stati selezionati per riportare i risultati significativi, solo i vetrini nei quali è stato possibile trovare qualcosa di anomalo.

Vetrino 4, placenta 1: versante fetale con minima porzione deciduale.

Si tratta di una placenta in cui si osserva una area infartuale recente (presenza di emorragia, deposizione di fibrina e carioressi). Alcuni vasi hanno lume oblitterato per un ispessimento concentrico della media per iperplasia miocitaria.

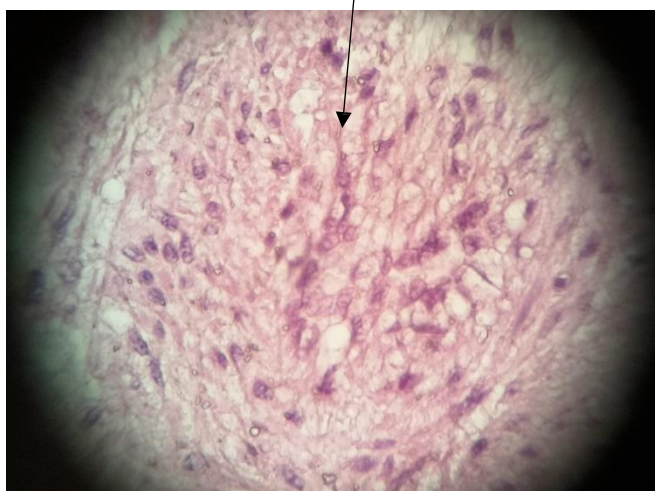


Fig.25 A e B, sezioni corrispondenti al vetrino 4, a diversi ingrandimenti. Le frecce indicano iperplasia miocitaria.

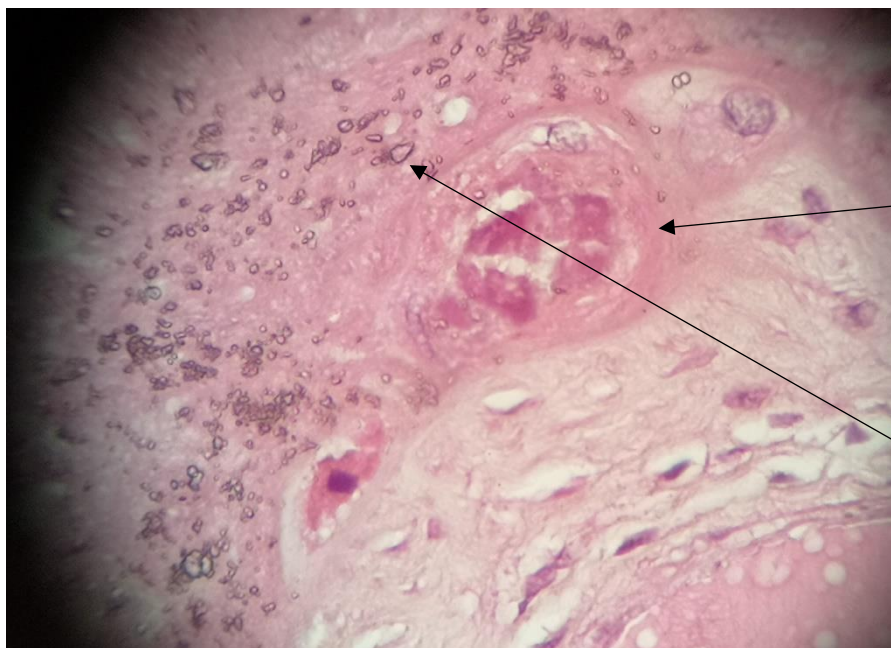


Fig.26, appartenente al vetrino 4.

Si osservano calcificazioni distrofiche

Cristalli di formalina

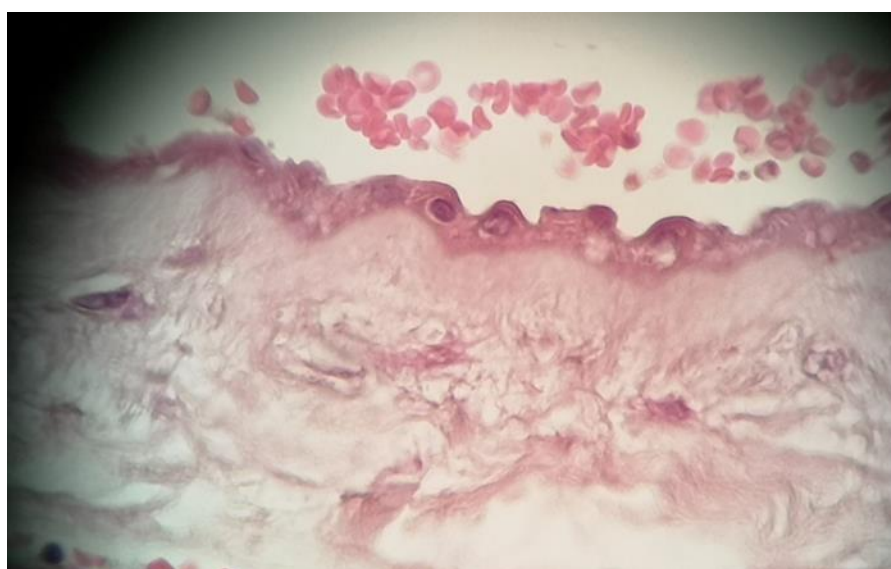
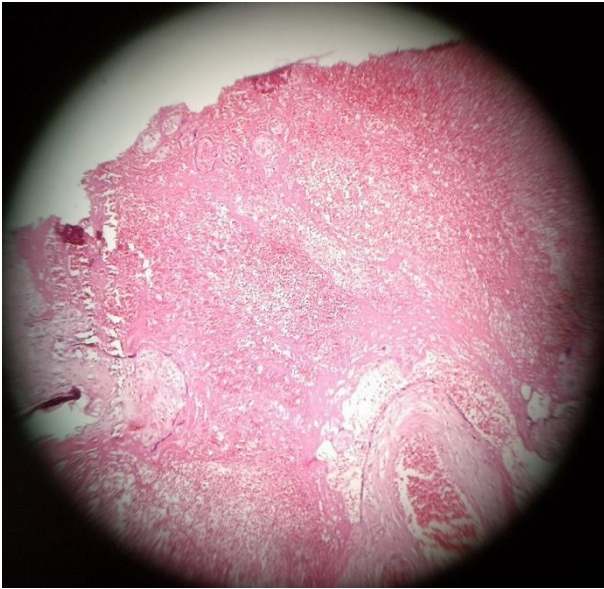


Fig.27 Sezione istologica appartenente al vetrino 4.

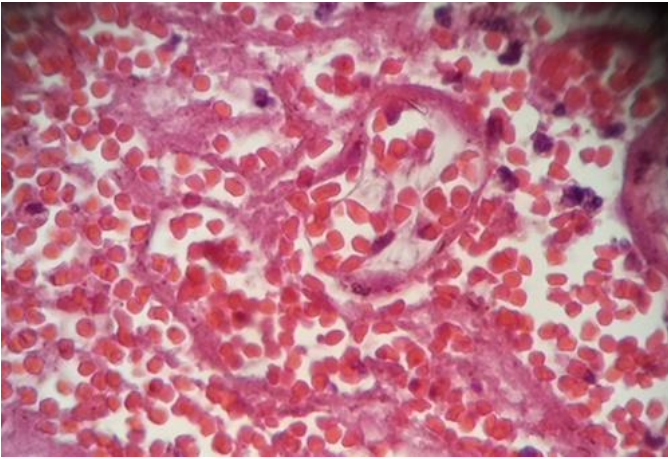
Membrana corioamniotica regolare.



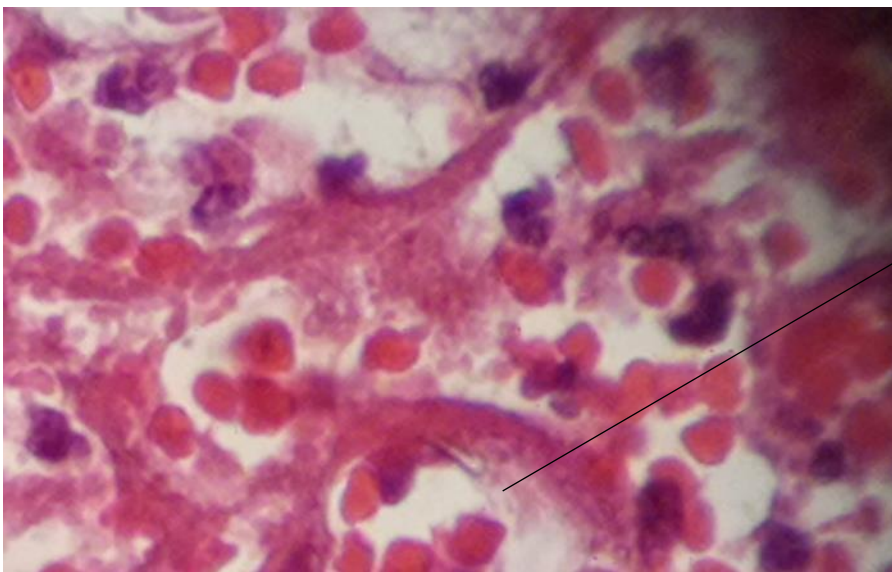
A

Fig.28 A,B e C Sezione istologica appartenente al vetrino 4.

Aree di infarto di tipo ischemico, ad ingrandimenti differenti



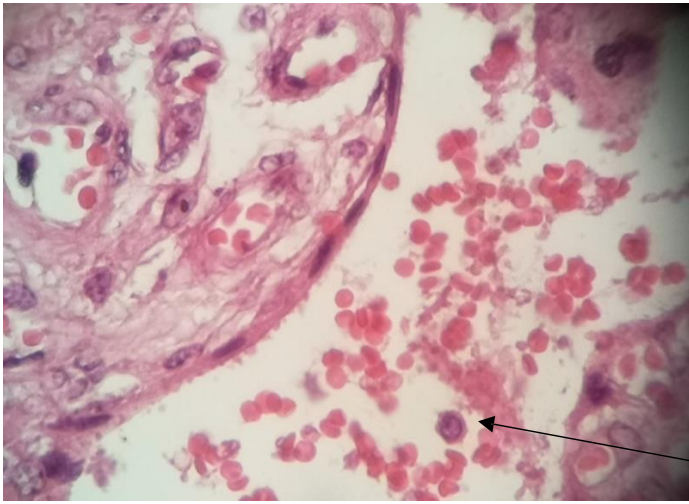
B



Formazione
cristallina

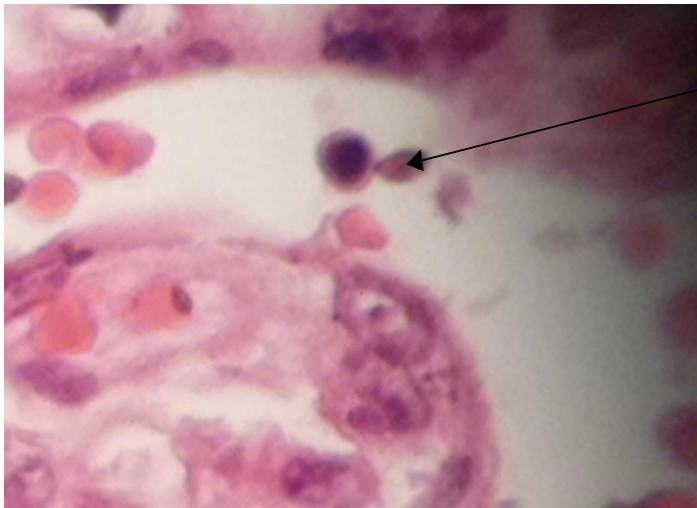
C

Nelle seguenti immagini corrispondenti al vetrino 8, si tratta di tessuto placentare, versante materno che non mostra segni né di flogosi, né di infiammazione. Il quadro morfologico è tipico di una ipossia cronica villare con abbondante deposizione di materiale fibroialino e iperplasia delle gemme sinciziali (segno di crescita reattiva del trofoblasto) con formazione di veri e propri nodi (segno di ipossia cronica di lunga durata). Si osservano inoltre segni di corangiosi.



A

Fig.29 A e B Spazio intervilloso in cui si osservano eritrociti maturi e monocita e forse un eritroblasto



B

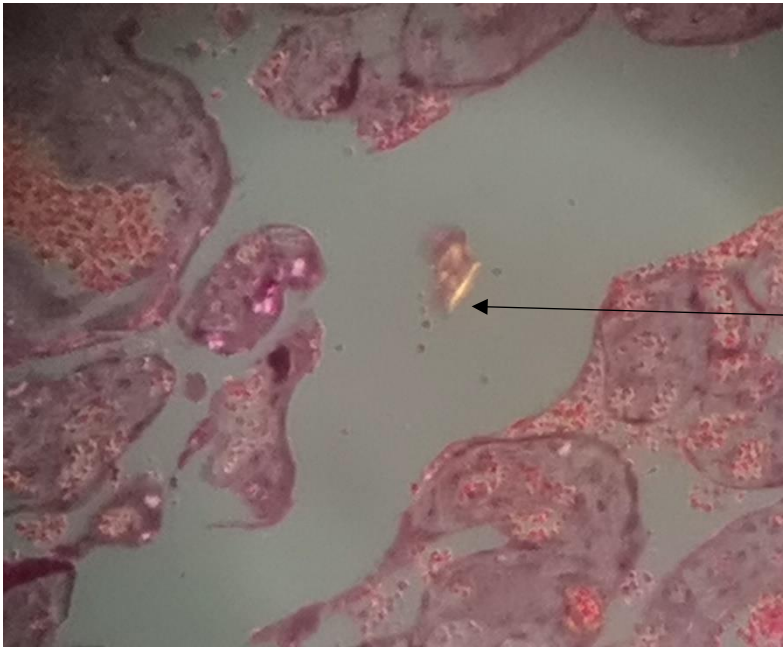
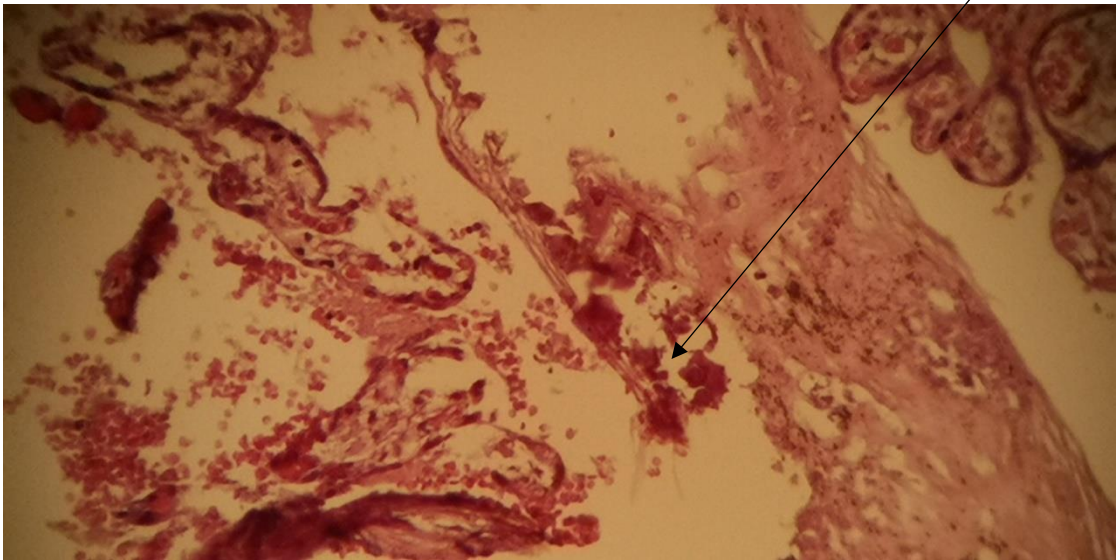


Fig. 30 A luce polarizzata si osserva nel contesto di materiale ialino (visibile solo con la luce polarizzata) una struttura birfrangente ad abito fibroso.

Fig.30 B Si osservano depositi di calcio



B

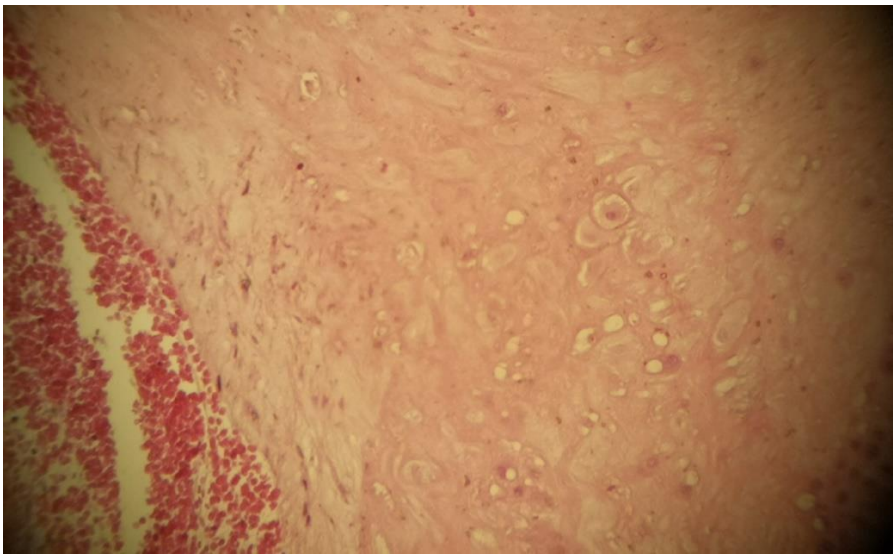
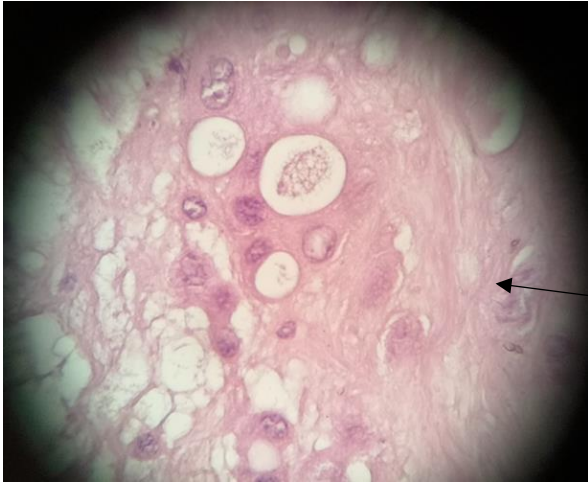
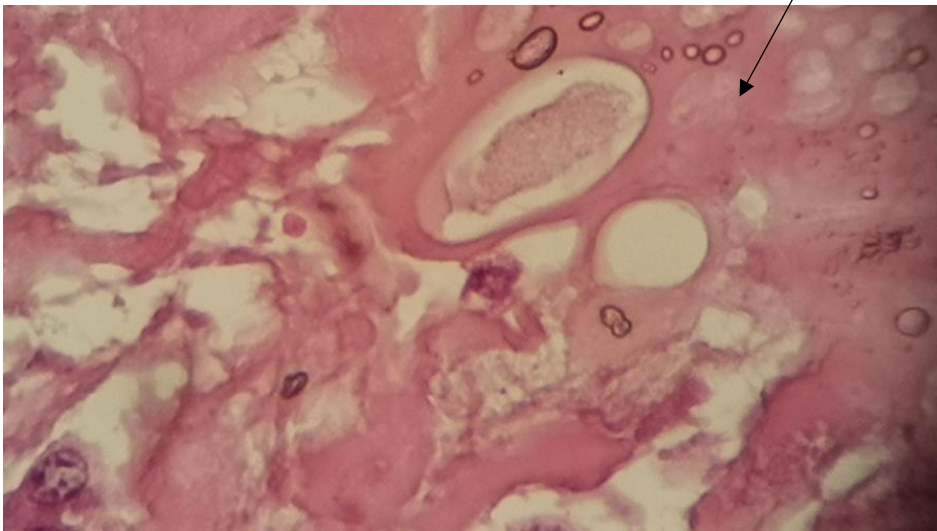


Fig.31,immagine della decidua che risulta ispessita, con abbondante deposito di materiale ialino in cui sono elementi deciduoidi con alterazioni vacuolari.



A

Fig.32 A e B Degenerazione deciduale in corso di ipossia



B

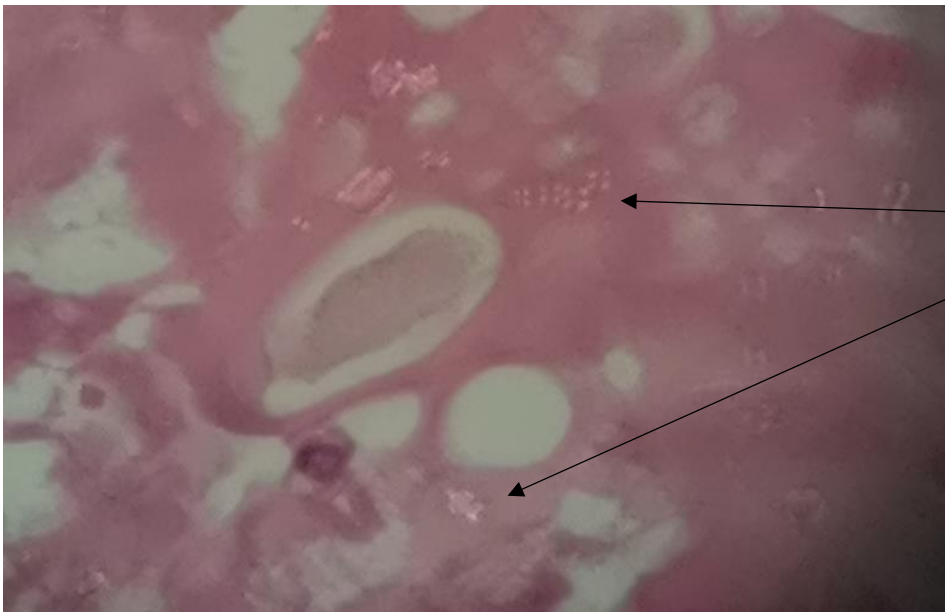
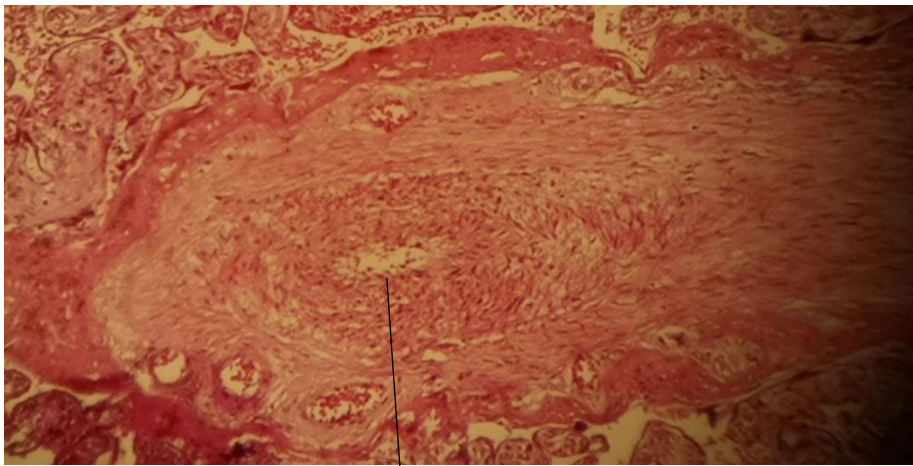
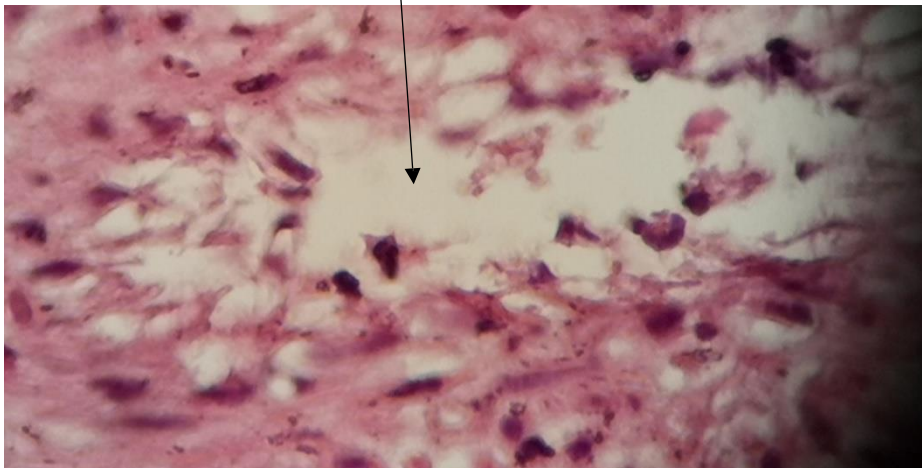


Fig.33
L'osservazione a luce polarizzata evidenzia cristalli riferibili a colesterolo e altro materiale birifrangente di forma irregolare,



A



B

Fig. 34 A e B Si osservano i vasi con spessa parete fibromuscolare. Il lume è ridotto e in alcuni campi ristretto per una iperplasia delle cellule miocitarie subintimale e della media.

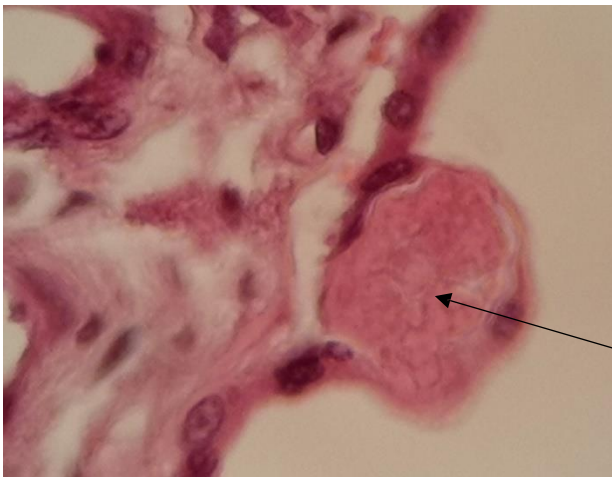


Fig.34 Materiale ialino depositato nel contesto di un ramo villosa terminale.

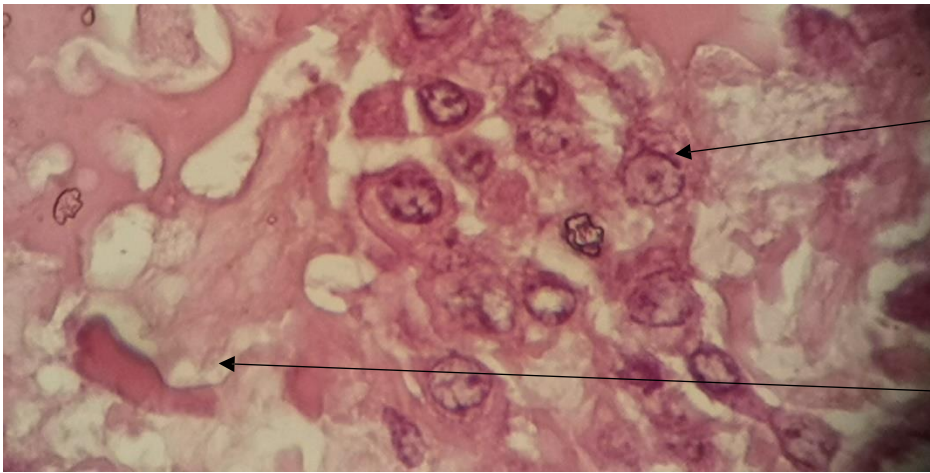


Fig.35 Cellule deciduoidi

In parte il materiale ialino depositato tende a calcificarsi

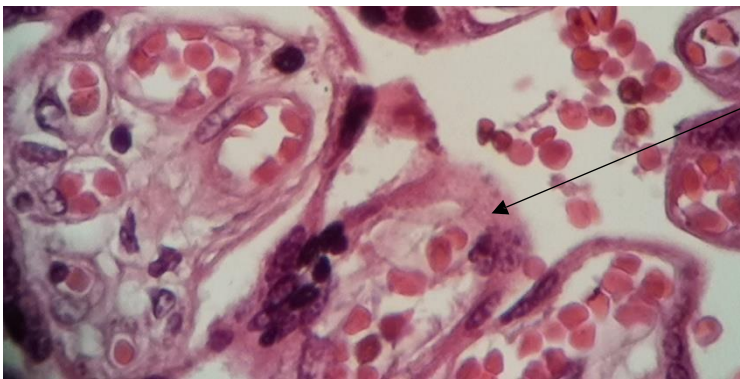


Fig.36 Iperplasia delle gemme sinciziali

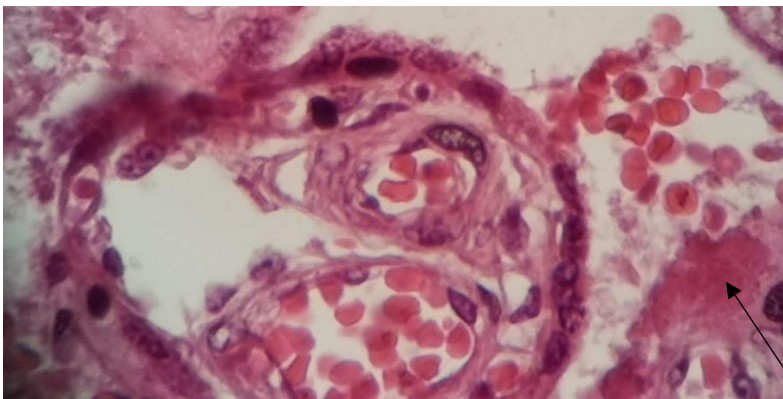


Fig. 37 Villo terminale maturo con vasi circondati da endotelio tumido, contenenti nel lume eritrociti privi di nucleo. Anche nello spazio intervillositario si osserva deposizione di materiale ialino.

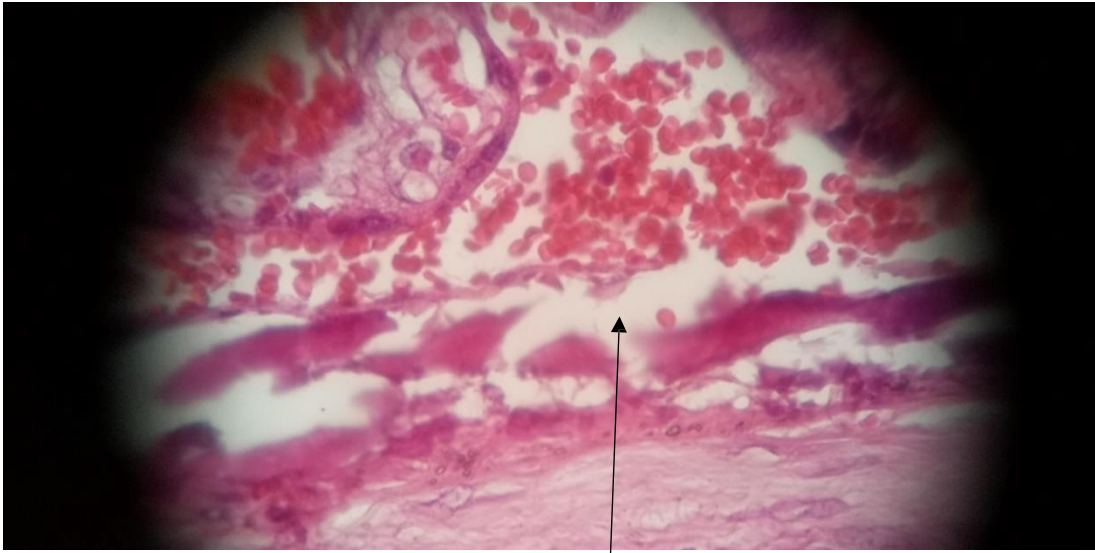


Fig.38 Si segnala la presenza di calcificazioni distrofiche lungo lo spazio intervillosario.

4.2 ANALISI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE:

Per quanto riguarda la tecnica per l'indagine al SEM/EDS è stata effettuata una prova preliminare utilizzando i campioni 1, 6, 9, 10 relativi al caso esaminato in microscopia ottica, facendo riferimento al protocollo messo a punto dal laboratorio del Centro Universitario Interdipartimentale Scansetti dell'università di Torino (Belluso et al., 2006).

Sono stati consegnati presso il laboratorio del Dipartimento di Scienze della Terra (DST) dell'Università degli Studi di Torino 4 campioni (conservati in formalina al 10%):

- campione 1 - 1 g
- campione 6 - 1 g
- campione 9 - 0,6 g
- campione 10 - 0,37 g

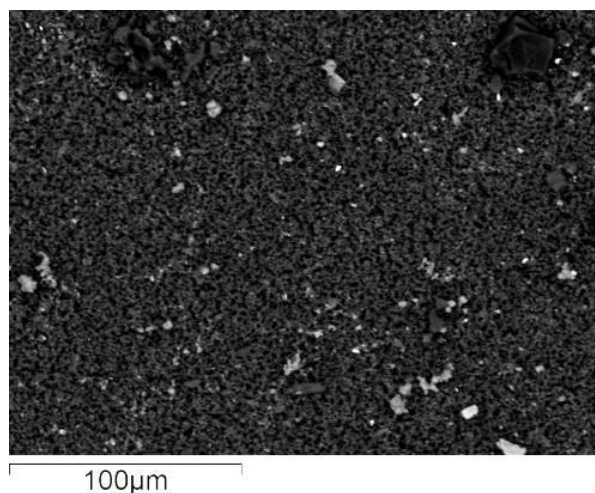
Dalla prima valutazione si evidenzia che, innanzi tutto, sarebbe necessario prelevare più materiale per questo tipo di analisi, almeno 3 grammi per campione, necessario per poter ricavare il peso secco di ciascun campione al fine di valutare la concentrazione di fibre eventualmente rilevate espresse in numero di fibre per grammo di tessuto secco.

In seguito, i campioni sono stati esaminati al SEM/EDS ad un ingrandimento di 4000x, utilizzando contemporaneamente il rivelatore per gli elettroni secondari (per la morfologia) e quello per gli elettroni retrodiffusi (per mettere meglio in evidenza le particelle inorganiche e discriminarle da quelle organiche).

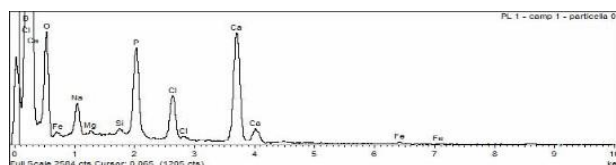
In questa fase preliminare si è proceduto all'indagine di alcuni campi microscopici (da 4 a 8 in funzione della quantità di particelle presenti in ciascuna videata) per ciascun campione e principalmente alla valutazione della distribuzione e identificazione del materiale inorganico sulla membrana. Di seguito sono riportati, per ciascun campione, un'immagine della distribuzione generale delle particelle sulla membrana e alcuni spettri energetici, rappresentativi delle particelle analizzate.

CAMPIONE 1:

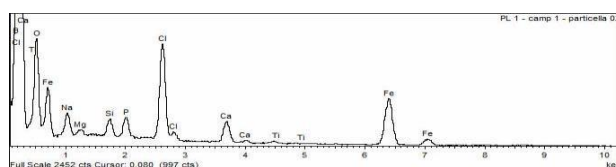
Visualizzazione con elettroni retrodiffusi. A basso ingrandimento si osservano diverse particelle. Per la lettura dei vari picchi degli spettri EDS, non si è tenuto conto della presenza di sodio e cloro in quanto in realtà appartengono alla cristallizzazione di NaCl a partire dall'ipoclorito di sodio utilizzato per la digestione della componente organica.



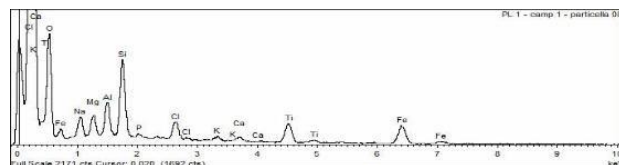
In questo primo spettro EDS è possibile identificare la presenza di picchi relativi al calcio, al fosforo e all'ossigeno, potrebbe essere quindi riconducibile a fosfato di calcio, nome mineralogico idrossiapatite con formula $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$.



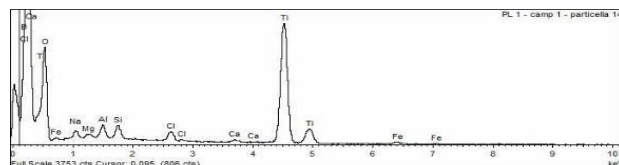
In questo secondo spettro è possibile evidenziare un'elevata quantità di ferro, silicio e tracce di titanio, con possibile presenza di idrossiapatite.



Relativo a questo spettro invece, l'alta concentrazione di silicio potrebbe far pensare alla presenza di qualche minerale riconducibile ai silicati, in particolare le intensità dei picchi portano ad ipotizzare ad una fase fillosilicatica.

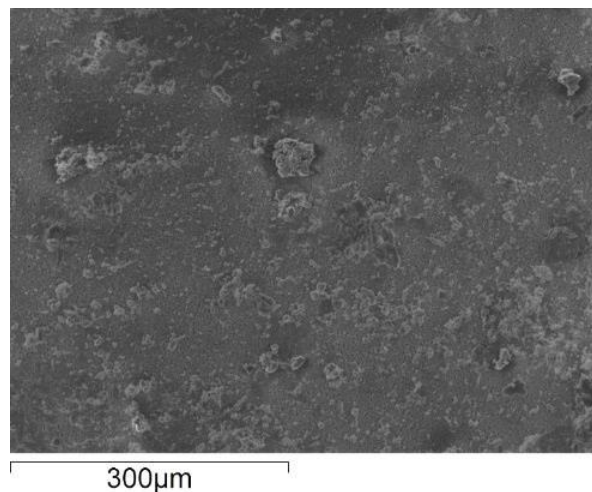


In questa quarta particella, si evidenzia un'elevata concentrazione di ossigeno e titanio, con possibile associazione in biossido di titanio. Si osservano, inoltre, tracce di silicio, alluminio calcio e ferro.

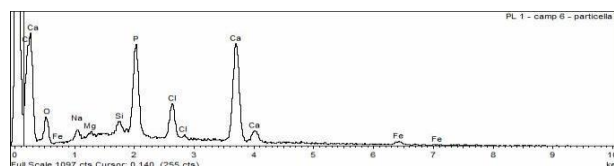


CAMPIONE 6:

Visualizzazione con elettroni secondari, dove si può osservare il tessuto a basso ingrandimento.

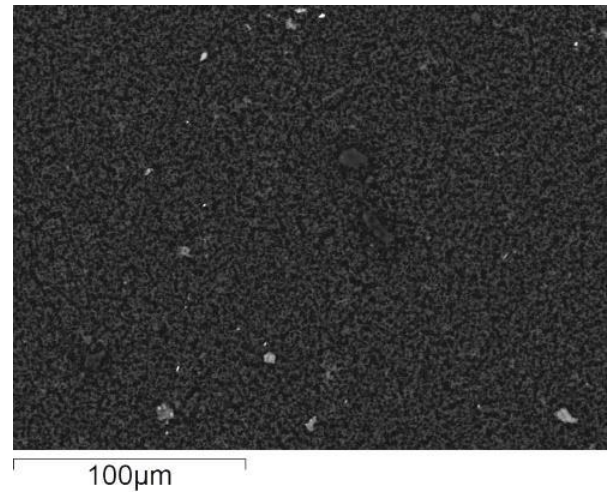


In questo spettro è osservabile la presenza marcata di calcio e fosforo, anche in questo campione, come nel campione 1, lo si può ricondurre a fosfato di calcio.

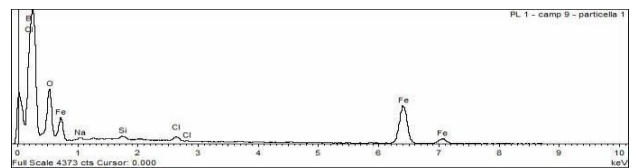


CAMPIONE 9:

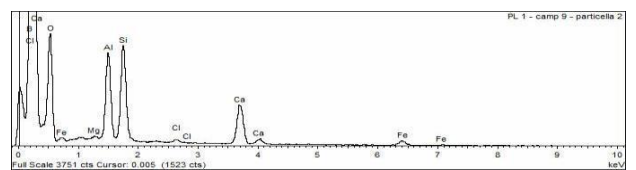
Visualizzazione in elettroni retrodiffusi, attraverso cui si evidenzia la presenza di particelle già a basso ingrandimento. Anche in questo campione non si è tenuto conto della presenza del sodio e di cloro osservati



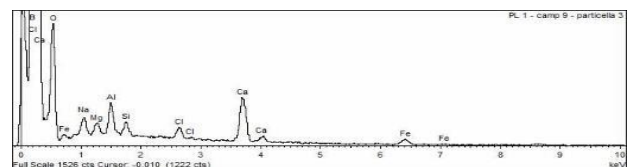
In questo spettro possiamo notare l'elevata presenza di ferro e ossigeno, riconducibile a ossidi di ferro.



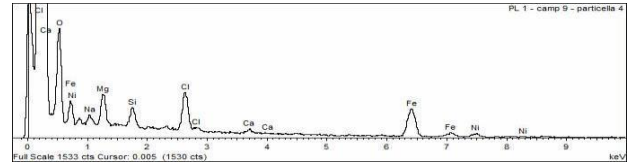
In questo secondo spettro è possibile evidenziare nuovamente silicio, alluminio e ossigeno in alte concentrazioni, con tracce di ferro, i quali associati danno origine a minerali di natura silicatica.



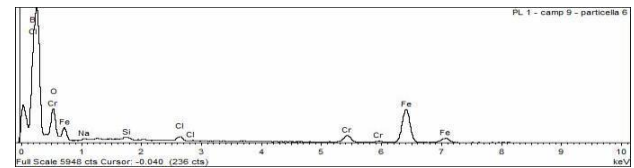
In questo spettro si nota la presenza di calcio, alluminio, silicio e ferro con intensità dei picchi che indicano concentrazioni decrescenti.



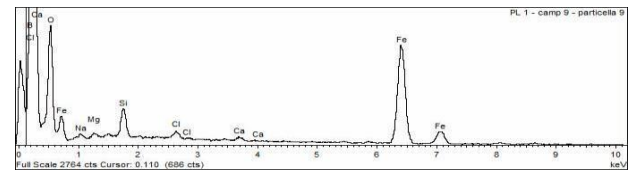
In questo spettro si può evidenziare la presenza di ferro e nichel, inoltre, si evidenziano magnesio e silicio, con rapporti di intensità dei picchi che potrebbero essere ascrivibili ad una fase di serpentino, famiglia di minerali silicatici.



Lo spettro EDS riportato in questa immagine permette di identificare la particella analizzata ad una particella metallica con composizione di ferro e cromo.

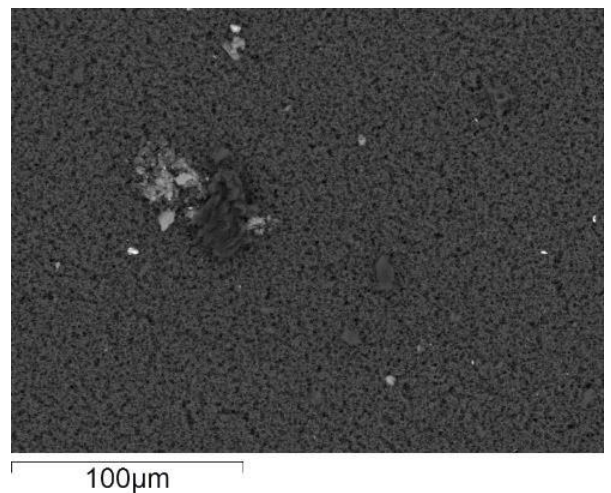


In quest'ultimo invece si evidenzia nuovamente la presenza di ferro, silicio e ossigeno, la cui combinazione può essere ascritta alla presenza di silicati e ossido di ferro. Si osservano anche tracce di calcio.

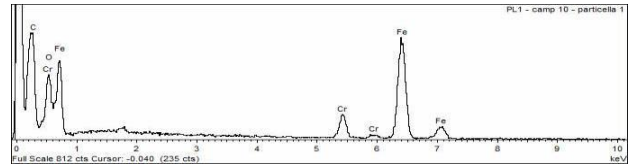


CAMPIONE 10:

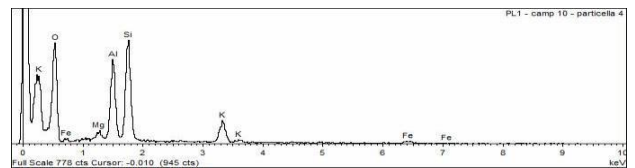
Visualizzazione in elettroni retrodiffusi, dov'è possibile notare diverse particelle già a basso ingrandimento. Anche per quest'analisi dei picchi, sono stati esclusi dai risultati i picchi relativi a cloro e sodio, per i motivi sopra descritti.



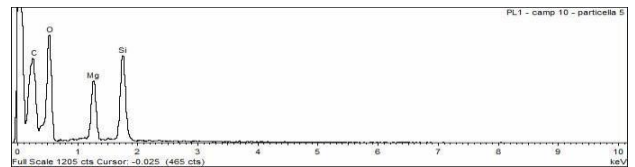
In questo spettro possiamo evidenziare nuovamente particelle metalliche con composizione chimica riconducibile ferro e cromo, come anche nel campione 9.



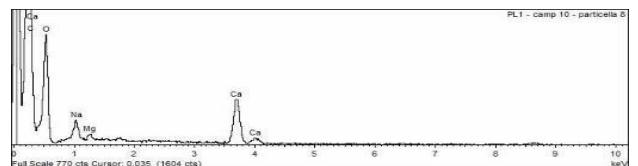
In questo secondo spettro è interessante notare la presenza di silicio e alluminio, nuovamente riconducibile ai silicati, e si evidenzia anche la presenza di potassio e tracce di ferro.



Qui si possono notare elevate quantità di magnesio, silicio e ossigeno. Le intensità relative tra i picchi permettono di attribuire la particella analizzata a talco, fillosilicato con composizione chimica $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$.



In quest'ultimo spettro EDS si evidenzia la presenza di calcio e ossigeno, con tracce di magnesio.



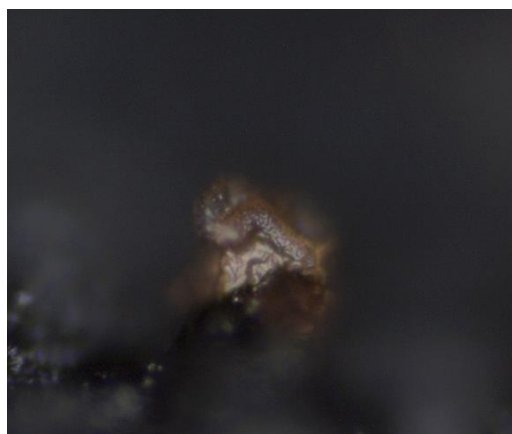
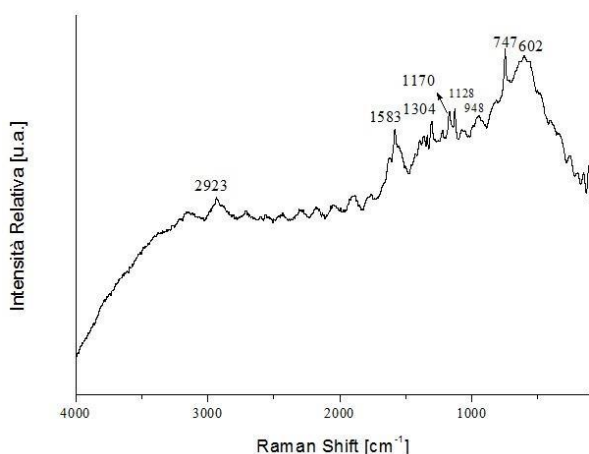
4.3 ANALISI IN SPETTROSCOPIA MICRO-RAMAN

Per l'analisi mediante spettroscopia micro-Raman, ci si è approcciati con diverse metodiche alla tecnica: inizialmente i campioni sono stati analizzati a fresco, in seguito a conservazione in formalina, per evidenziare eventuali presenze di materiale non appartenente al campione, di natura inquinante. Inizialmente è stato impiegato un laser verde a 532 nm, successivamente anche un laser rosso a 633 nm.

Poi l'analisi si è concentrata sui vetrini precedentemente analizzati in microscopia ottica.

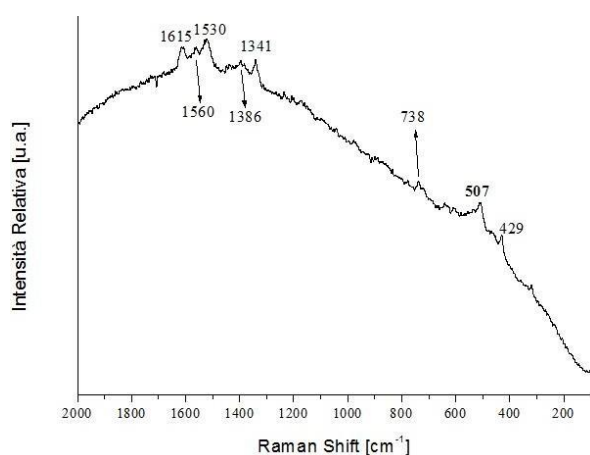
In generale, in entrambi i casi, la tecnica si è riscontrata efficace, inquanto si riesce a visualizzare correttamente ciò che è da analizzare e senza fatica si rileva la particella. Però in nessuno dei due casi è stata evidenziata la presenza di materiale non appartenente fisiologicamente al campione. Infatti, tutto ciò che è stato analizzato è riconducibile a materiale organico fisiologicamente presente nel campione.

Sotto sono riportati gli spettri appartenenti alle particelle analizzate di rilevanza maggiore, tutti gli spettri sono stati eseguiti su campione a fresco.

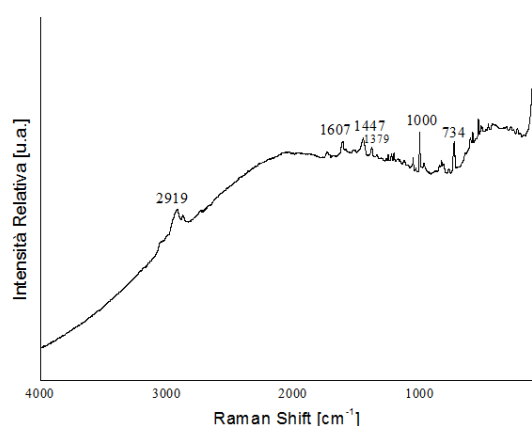


Lo spettro sopra riportato appartiene alla particella rappresentata a fianco, corrispondente al campione di placenta caso 1, con visualizzazione del campione a fresco. In questo spettro vengono identificati differenti bande. La banda a più alti numeri d'onda, a circa 2925 cm⁻¹, permette di identificare la componente analizzata come una matrice di tipo organico: infatti,

in questa zona dello spettro giacciono i moti vibrazionali ai legami chimici CH₂ e CH₃, caratteristici di questi materiali. Considerando gli shift vibrazionali e la complessità dell'attribuzione delle bande dovuti agli shift vibrazionali derivanti dalle condizioni di analisi, risulta complessa una definitiva attribuzione della totalità delle bande Raman rilevate.



In quest'altro spettro, relativo sempre al precedente campione, si evidenziano una serie di bande nel range spettrale a più alti numeri d'onda, possibilmente associabile a materiale ricco in collagene, riconducibile quindi alla componente organica del campione. Inoltre è visualizzabile un picco a 507, il quale è riconducibile ai minerali feldspati, infatti lo spettro Raman dei feldspati è facilmente riconoscibile dalla presenza di due o tre picchi situati tra 450 e 515 cm⁻¹. Inoltre il picco a 429 cm⁻¹ potrebbe essere shiftato a causa di vicarianze, rientrando quindi nel range 450-515. (Dos Santos E.C. et al, 2016; Fuertes de la Llave V. et al 2019).



Infine, questo spettro mostra bande ben definite, riconducibili anch'esse a materiale di natura lipidica, associabile alla componente organica del campione. (E.C. Dos Santos et al, 2016)

5. CONCLUSIONI

Per riassumere i risultati ottenuti, si potrebbe concludere che, per quanto riguarda la microscopia ottica, essa è una tecnica utile per la ricerca inquinanti ambientali nei tessuti umani per diversi motivi:

- **Risoluzione adeguata:** ha una risoluzione che permette di osservare particelle di dimensioni micrometriche. Anche se non può risolvere particelle nanometriche, è sufficiente per identificare le particelle di interesse, tra cui anche le microplastiche.
- **Preparazione dei campioni:** i metodi di preparazione dei campioni per la microscopia ottica sono relativamente semplici. Tecniche come la colorazione e il montaggio possono essere utilizzate per migliorare il contrasto e facilitare l'identificazione delle particelle e delle caratteristiche istologiche dei tessuti.
- **Documentazione e condivisione:** le immagini ottenute tramite microscopia ottica possono essere facilmente documentate e condivise, permettendo una revisione e una collaborazione più efficace tra i ricercatori.

In sintesi, la microscopia ottica rappresenta una tecnica efficace, accessibile e versatile per lo studio degli inquinanti nei tessuti umani, fornendo una buona combinazione di risoluzione, facilità d'uso e capacità analitiche.

Per quanto riguarda, invece, l'analisi attraverso microscopia elettronica a scansione (SEM), essa è una tecnica con alta risoluzione, ma presenta alcune limitazioni e sfide specifiche per l'analisi delle particelle inquinanti nei tessuti umani:

- **Preparazione dei campioni:** la preparazione dei campioni per SEM è complessa e può essere distruttiva. I campioni biologici devono essere processati e fissati per procedere all'analisi mediante la SEM.
- **Identificazione chimica:** sebbene il SEM fornisca eccellenti immagini ad alta risoluzione delle superfici, l'identificazione chimica delle microplastiche richiede tecniche supplementari come la spettroscopia micro-Raman. Infatti, la composizione a base di C delle plastiche, non ne permettono la sicura distinzione dal punto di vista chimico rispetto al filtro in polycarbonato su cui le particelle sono deposte o al tessuto organico. Inoltre, la natura organica delle plastiche potrebbe causarne la distruzione

durante la preparazione del campione mediante attacco chimico della componente biologica. Motivo per cui potrebbero non essere più presenti nell'analisi.

- Profondità di campo limitata: mentre SEM fornisce immagini dettagliate della superficie, ha una profondità di campo limitata. Questo può essere un problema per l'analisi di strutture tridimensionali complesse, come i tessuti biologici, dove le particelle inquinanti possono essere distribuite in profondità.

Nonostante queste limitazioni, il SEM è estremamente utile in molte applicazioni e può fornire dettagli su diversi inquinanti ambientali e componenti non organiche. Tuttavia, per l'analisi di microplastiche nei tessuti umani, le sue limitazioni pratiche e tecniche spesso richiedono l'uso di tecniche complementari come la microscopia ottica o altre forme di microscopia o spettroscopia avanzate. Dunque, questa tecnica si può definire applicabile all'identificazione di materiali inorganici all'interno dei tessuti di placenta.

Infine, per quanto concerne la spettroscopia a micro-Raman, essa è una tecnica eccellente per la ricerca dei diversi inquinanti nei tessuti umani per diversi motivi:

- Identificazione chimica: fornisce informazioni chimiche specifiche sui materiali analizzati. Ogni materiale ha uno spettro Raman unico che può essere utilizzato per identificarlo con precisione, consentendo di distinguere tra diversi tipi di inquinanti (in particolare nel caso delle microplastiche) presenti nei tessuti.
- Non distruttiva: è una tecnica non distruttiva, il che significa che i campioni di tessuto possono essere analizzati senza subire danni significativi. Questo è particolarmente importante quando si analizzano campioni biologici delicati.
- Minima preparazione dei campioni: la preparazione dei campioni per questa tecnica è relativamente semplice e non richiede processi complessi previsti per la microscopia elettronica a scansione. I campioni possono spesso essere analizzati direttamente o con una preparazione minima.
- Versatilità: può essere combinata con altre tecniche di microscopia, come la microscopia ottica, per ottenere una caratterizzazione più completa dei campioni. Ad esempio, è possibile localizzare le particelle inorganiche o le microplastiche con la microscopia ottica e poi analizzarle spettroscopicamente con la spettroscopia Raman.

In sintesi, la spettroscopia a micro-Raman è una tecnica potente e versatile per la ricerca delle microplastiche e degli inquinanti nei tessuti umani. Offre identificazione chimica precisa, alta risoluzione spaziale, compatibilità con campioni biologici e minima preparazione dei campioni, rendendola una scelta eccellente per studi su microplastiche nei contesti biologici.

In conclusione, si è dimostrato con questo lavoro di tesi come l'applicazione combinata di microscopie ottica ed elettronica a scansione con annessa EDS e della spettroscopia micro-Raman sia possibile anche su materiali organici derivanti da placenta ed abbia mostrato grandi potenzialità nell'identificazione sia delle particelle inquinanti che dei tessuti sottoposti all'analisi. Questo approccio permetterà di caratterizzare a fondo il carico di inquinanti e le caratteristiche istologiche di tessuti derivanti da placenti di partorienti.

6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Abb M., T. Heinrich, E. Sorkau, and W. Lorenz. Phthalates in house dust. *Environment International*; 2009; 35 (6); 965-970.
- Ait Bamai Y., Araki A., Kawai T., Tsuboi T., Saito I., Yoshioka E., Kanazawa A., Tajima S. Associations of phthalate concentrations in floor dust and multi-surface dust with the interior materials in Japanese Dwellings. *Science of The Total Environment*; 15 January 2014; 468–469; 147-157
- *Anatomia umana*, Martini, Tallitsch, Nath, VII edizione 2019; Edises.
- *Appunti per biologi su cristalli e minerali*, Rinaudo e Croce 2020; TAB edizioni.
- Barrier, Enas R. Abdel Hameed. Heavy Metals Can either Aid or Oppose the Protective Function of the Placental. *Maced J Med Sci*; Sept 2019; 7(17); 2814–2817.
- Blackburn K, Green D. The potential effects of microplastics on human health: What is known and what is unknown. *Ambio*; 2022; 51; 518–53.
- Choe S-A, Jun Y-B, Kim S-Y. Exposure to air pollution during preconceptional and prenatal periods and risk of hypertensive disorders of pregnancy: a retrospective cohort study in Seoul, Korea. *BMC Pregnancy and Childbirth*; 2018; 18; 340.
- De Vuyst et al. Guidelines for mineral fibre analyses in biological samples: report of the ERS Working Group. *European Respiratory Journal*; 1998; 11; 1416-1426.
- Dos Santos E.C, Da Silva Martinho H.S., Annes K., Da Silva T., Soares C.A., Ferreira Leite R., Pecora Milazzotto M. Raman-based noninvasive metabolic profile evaluation of in vitro bovin embryos. *Journal of Biomedical Optics*; 2016; 21 (7); 075002.
- *Embriologia umana*, M. De Felici. Piccin.
- *Embriologia*, M. Barbieri, P. Carinci, Terza Edizione. Casa Editrice Ambrosiana.
- Fisher RM, Gupta V. Heavy Metals. [Updated 2024 Feb 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557806/>
- Fuertes de la Llave V., del Campo A., Fernández J.F., Enríquez E. Structural insights of hierarchically engineered feldspars by confocal Raman microscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*; May 2019;50 (5); 615-761.

- Gasperi, J., S.L. Wright, R. Dris, F. Collard, C. Mandin, M. Guerrouache, V. Langlois, F.J. Kelly, and B. Tassin. Microplastics in air: Are we breathing it in? *Current Opinion in Environmental Science & Health*; Feb 2018; 1; 1-5.
- Haque, A. K., Vrazel, D. M., Burau, K. D., Cooper, S. P., & Downs, T. Is there transplacental transfer of asbestos? A study of 40 stillborn infants. *Pediatric Pathology & Laboratory Medicine*; 1996; 16(6); 877–892.
- Högberg, J., A. Hanberg, M. Berglund, S. Skerfving, M. Remberger, A.M. Calafat, A.F. Filipsson, B. Jansson. Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environmental Health Perspectives*; 2008; 116 (39); 334 – 339.
- Hougaard KS, Jensen KA, Nordly P, Taxvig C, Vogel U, Saber AT, Wallin H. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. *Part Fibre Toxicol*; 2008; 5; 3.
- <http://www.issmc.cnr.it>)
- <http://www.istitutomedici.edu.it>
- <http://www.fluorescencemicroscopy.it>
- <https://healthy.thewom.it/gravidanza/placenta-previa/>
- <https://ilsalvagente.it/2022/03/25/microplastiche-trovate-per-la-prima-volta-nel-sangue-umano/>
- <https://manualedelgeologo.it/>
- <https://millegiorni.info/2020/01/13/inquinamento-effetti-sulla-salute-riproduttiva-e-neonatale/>
- <https://slideplayer.it/slide/993112/>)
- <https://www.dir.uniupo.it/course/view.php?id=18130>
- <https://www.fertilitycenter.it/eco/placenta-e-annessi>
- <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/m/microplastiche#effetti-sulla-salute-umana-e-sull%E2%80%99ambiente>
- <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/m/microplastiche#effetti-sulla-salute-umana-e-sull%E2%80%99ambiente>
- <https://www.medicinamaternofetale.it/medicina-materna/placenta/esame-istologico-placenta>
- <https://www.microbiologiaitalia.it/microscopia/colorazione-ematossilina-eosina/>

- <https://www.microbiologiaitalia.it/microscopia/il-microscopio-elettronico/>
- <https://www.treccani.it/enciclopedia/microplastiche/>
- https://www.unife.it/medicina/lm.medicina/studiare/minisiti/istologia-ed-embriologia/materiale_didattico/embriologia/2015-16/lezione-9_C
- Jenabi E., Salimi Z, Bashirian S., Khazaei S., Ayubi E. The risk factors associated with placenta previa: An umbrella review. *Placenta*; Jan 2022; 117;21-27.
- Jornet-Martínez, N., C. Antón-Soriano, and P. Campíns-Falco. Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-Line miniaturized reliable method. *Science of The Total Environment*; November 2015; 532; 239-244
- Kaiglová A, Reichrtová E, Adamčáková A, Wsólová L. Lactate dehydrogenase activity in human placenta following exposure to environmental pollutants. *Physiological research*; 2001; 50(5); 525-528.
- Kastury F, Smith E, Juhasz et al. A critical review of approaches and limitations of inhalation bioavailability and bioaccessibility of metal(loid)s from ambient particulate matter or dust; *Sci Total Environ*; 2017 Jan 1;574;1054-1074.
- Latini, G., C. De Felice, G. Presta, A. Del Vecchio, I. Paris, F. Ruggieri, and P. Mazzeo. In utero exposure to Di-(2-Ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environmental Health Perspectives*; Nov 2003; 111 (14); 1783 – 1785.
- Laxmi Singh. Environmental toxic metals in placenta and their effects on preterm delivery-current opinion. *Drug and Chemical Toxicology*; 2018; 43(5); 531–538.
- Liu N, Miyashita L, Mcphail G, Thangaratnam S, Grigg J. Eur Respir J. Late breaking abstract - do inhaled carbonaceous particles translocate from the lung to the placenta? *European Respiratory Journal*; 2018; 52;360.
- Main, K., G. Mortensen, M. Kaleva, K. Boisen, I. Damgaard, M. Chellakooty, I. Schmidt, A.M. Suomi. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environmental Health Perspectives*; Sept 2005; 114 (2); 270 – 276.
- Mcl.Mowat A. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*; 2003;3; 331–341.
- Molina-Mesa S. , Martínez-Cendán J.P., Moyano-Rubiales D., Cubillas-Rodríguez I., Molina-García J. , González-Mesa E. Detection of Relevant Heavy Metal

Concentrations in Human Placental Tissue: Relationship between the Concentrations of Hg, As, Pb and Cd and the Diet of the Pregnant Woman. *Int J Environ Res Public Health*; Nov 2022;19(22); 14731.

- Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, PHM H, Verbruggen A, Nemery B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in Hamster. *Am J Respir Crit Care Med*; 2001; 164 (9); 1553-1659.
- Olsson D, Mogren I, Eneroth K, Forsberg B. Traffic pollution at the home address and pregnancy outcomes in Stockholm. *BMJ Journals*; 2015; 1-8.
- Olsson D, Mogren I, Forsberg B. Air pollution exposure in early pregnancy and adverse pregnancy outcomes: a register-based cohort; *BMJ Open* 2013;3;e001955.
- Papan P., Kantapan J, Sangthong P, Meepowpan P, Dechsupa N. Iron (III)-Quercetin Complex: Synthesis, Physicochemical Characterization, and MRI Cell Tracking toward Potential Applications in Regenerative Medicine. *Contrast Media; Molecular Imaging*; 2020; 8877862; 22.
- Pedersen M, Stayner L, Slama R, Sørensen M, Figueras F, Nieuwenhuijsen MJ, et al. Ambient air pollution and pregnancy-induced hypertensive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Hypertensio*, Jun 2014;64;494–500
- Peretz, J., L. Vrooman, W.A. Ricke, P.A. Hunt, S. Ehrlich, R. Hauser, V. Padmanabhan, H.S. Taylor, et al. Bisphenol a and reproductive health: Update of experimental and human evidence, 2007–2013. *Environmental Health Perspective*; Aug 2014; 122(8); 775–786.
- Politi S, *Rivista di ostetricia ginecologia pratica e medicina perinatale* vol. XXIX n.1/ 2014
- Ruge C. A, Kirch J., Lehr C.M. Pulmonary drug delivery: From generating aerosols to overcoming biological barriers-therapeutic possibilities and technological challenges. *The Lancet, Respiratory Medicine*; 2013; 1 (5); 402-413.
- Schmid T. Dariz P. Shedding light onto the spectra of lime: Raman and luminescence bands of CaO, Ca(OH)₂ and CaCO₃. *Jornal of Raman Spectroscopy*; 2015; 46 (1); 1-6.
- Wang Q, Zhang H, Liang Q, Knibbs LD, Ren M, Li C, et al. Effects of prenatal exposure to air pollution on preeclampsia in Shenzhen, China. *Environ Pollut*; Jun 2018;237; 18-27.

7. RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto volevo ringraziare DAIRI Laboratorio integrato ricerca amianti, presso il presidio ospedaliero S. Spirito di Casale Monferrato, per avermi ospitato durante lo svolgimento del mio percorso di tirocinio dove ho potuto incrementare ed applicare le conoscenze teoriche apprese durante il percorso universitario. In particolare ringrazio il Professor Croce Alessandro per avermi supportata nel periodo dello svolgimento del tirocinio e per avermi aiutata nella stesura della tesi. Ringrazio anche la Dott.ssa Bertolotti Marinella per avermi accolta nel suo reparto durante tutto il tirocinio ed infine ringrazio la Dott.ssa Bellis Donata che mi ha supportata ed aiutata durante la scrittura della tesi. Vorrei ancora ringraziare la Dott.ssa Silvana Capella e la Dott.ssa Elena Belluso, del centro Universitario Interdipartimentale Scansetti dell'università di Torino per le analisi effettuate al SEM, attraverso cui ho potuto elaborare i dati per la tesi.

Voglio ringraziare inoltre tutti coloro che nel corso di questi due anni mi sono rimasti accanto. Vorrei partire ringraziando il mio fidanzato Marco, che in questi anni non mi ha mai abbandonata e si è sempre assicurato di garantirmi un sorriso ed un po' di leggerezza, restandomi accanto anche nei momenti in cui nemmeno io ci sarei rimasta. Mi hai regalato la spensieratezza di cui ho avuto bisogno ogni giorno in questi 5 anni assieme. Ringrazio poi la mia famiglia che non ha mai smesso un giorno di credere in me e di supportarmi. Grazie a voi, oggi posso festeggiare, non mi avete mai fatta sentire sbagliata, qualunque fosse il risultato, apprezzavate il mio impegno ed io non potrei essere più grata di avervi accanto!

Ringrazio ancora i miei amici e colleghi dell'università, con i quali ho potuto passare sia i momenti belli che quelli più difficili affrontandoli con più serenità senza sentirmi mai sola, senza di voi questo percorso non sarebbe finito allo stesso modo.

Ed infine ringrazio me, perché ho creduto fino all'ultimo di riuscirci, ringrazio me per aver avuto sempre l'obiettivo ben saldo in mente e per non aver mai mollato.

Lo dico dalla prima superiore ed ora posso finalmente confermarlo:

LABOR OMNIA VINCIT

