



NANODIAGNOSTICS

RAPPORTO n° 26/2008

Del 28 Luglio 2008

NANODIAGNOSTICS srl
Via E. Fermi, 1/L - 41057 San Vito di Spilamberto (Modena) - Italy
Tel. +39 059 - 798778 - Fax +39 059 7579182
E-mail info@nanodiagnosics.it

RAPPORTO

N° 26/2008

**VALUTAZIONE DI REPERTO BIOPTICO TRAMITE INDAGINE
NANODIAGNOSTICA DI MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE E
MICROANALISI A RAGGI X.**

Committente : Attianese Antonio

Materiale in esame : blocchetto in paraffina n. 04 CB 266

Responsabile: Dott.ssa Antonietta M. Gatti

Firma:



Data: 28 luglio 2008

Il presente rapporto si compone di 21 (ventuno) pagine compresa la copertina.

Nota:

I risultati sono da riferirsi solo al materiale esaminato e per il tipo di applicazione richiesta.
In caso di riproduzione del presente documento, il Committente s'impegna a farlo solo in modo integrale.
Un'eventuale riproduzione parziale deve essere autorizzata per iscritto da Nanodiagnosics srl.

INDICE

1. Introduzione 4

2. Materiali..... 5

3. Tipi di analisi eseguite 6

4. Preparazione dei campioni..... 6

5. Risultati 6

 Reperto 1, vescica – neoplasia transizionale papillare di basso grado..... 7

6. Conclusioni..... 18

7. Legenda 18

8. Riferimenti bibliografici 19

1. Introduzione

Nanodiagnosics srl è un'azienda di consulenze scientifiche nei settori della medicina, dell'industria e dell'ecologia. L'attività principale è il rilevamento tramite una tecnica innovativa di microscopia elettronica ambientale di micro- e nanoparticelle inorganiche in qualsiasi mezzo (tessuti biologici, alimenti, farmaci, cosmetici, campioni ambientali, ecc.).

L'indagine si avvale principalmente di un FEG - ESEM (Field Emmission Gun - Environmental Scanning Electron Microscope), cioè un microscopio elettronico a scansione ambientale a emissione di campo, opportunamente modificato.

Quest'analisi offre la possibilità di osservare campioni biologici in "wet mode", vale a dire in condizioni di normale idratazione, a pressione atmosferica, senza la necessità di essicarli e di renderli elettroconduttivi tramite una ricopertura di carbone oppure di metalli quali l'oro e il palladio. Applicando protocolli da adattare ad ogni tipo di osservazione, una simile caratteristica consente di esaminare campioni biologici, comprese cellule vive, senza intaccarne l'integrità, e di ripetere l'osservazione ogni volta lo si desidera. Il principale obiettivo dell'indagine, l'individuazione di micro- e nano-particolato inorganico eventualmente contenuto nell'esemplare in studio, viene raggiunto senza alcun processamento del campione.

Ognuno dei preparati viene osservato in tutta la sua estensione sotto il microscopio in diverse modalità: SED (elettroni secondari) e BSE (elettroni retrodiffusi), in basso vuoto (0,98 Torr), a 25-30 KV e con spot vari, a seconda dell'ingrandimento (da 6 a 4), con una distanza di 10 mm.

Sul particolato rilevato si punta la sonda microanalitica a raggi X per determinarne la composizione chimica. Una microanalisi a raggi X a dispersione d'energia (EDS, cioè Energy Dispersive Spectroscopy), misurando l'energia caratteristica che i vari elementi costituenti il campione restituiscono sotto forma di radiazioni X dopo essere stati colpiti dal fascio elettronico emesso dalla sorgente, fornisce la composizione chimica elementare del particolato rinvenuto. Ogni reperto è stato debitamente fotografato ed archiviato insieme con lo spettro degli elementi individuati.

L'analisi non è distruttiva ed è ripetibile, con la sola eccezione dei fluidi, spesso impossibili da recuperare.

L'indagine può essere svolta su campioni di origine biologica come biopsie, autopsie, liquidi organici o alimenti, ma è eseguibile anche su molti altri tipi di materiali quali, ad esempio, campioni ambientali, farmaci o cosmetici. Essendo l'oggetto principale dell'indagine di natura inorganica non biodegradabile, non ci sono difficoltà nell'individuare particolato del genere sia in campioni freschi sia in campioni d'archivio.

2. Materiali

E' pervenuto al Laboratorio il seguente reperto:

Reperto n. 1 (cod. Lab. 584 GW)

Data: 16/7/08

Materiale: blocchetto in paraffina n. 04 CB 266

Sede: vescica

Descrizione reperto: blocchetto in paraffina n. 04 CB 266 con frammenti biotipici di neoformazione della **vescica** con diagnosi di **neoplasia transizionale papillare di basso grado**; campione proveniente dal "Centro Barberio" Diagnostica e Tecnica Cito-Istopatologica della Nuova Clinica S. Rita - Napoli.



3. Tipi di analisi eseguite

Lo studio ha comportato l'utilizzo della tecnica di microscopia elettronica a scansione ambientale (FEG - ESEM) per verificare l'eventuale presenza di polveri ambientali, e di microanalisi a raggi X (EDS) per valutarne la composizione chimica come descritto al paragrafo 1. Nessun processamento è stato eseguito sul reperto che è stato, quindi, esaminato tal quale. La metodica, risultato del progetto comunitario europeo QLRT-2002-147 (Nanopathology), permette di valutare anche la presenza di particelle di dimensioni nanometriche (vedi riferimenti bibliografici 1- 33).

4. Preparazione dei campioni

Dal blocchetto in paraffina pervenuto in laboratorio sono state tagliate mediante microtomo Leitz (Germania) alcune sezioni istologiche da 12 micron di spessore ciascuna. Le sezioni sono state poi depositate su supporti di acetato e si è proceduto alla loro deparafinizzazione mediante dissoluzione con xilolo. Successivamente, le sezioni sono state montate su supporto (stub) per mezzo di un disco biadesivo di Carbonio e quindi, dopo essiccazione in stufa a 40 °C per 6 ore, sono state osservate al microscopio elettronico.

5. Risultati

Le analisi di microscopia elettronica hanno messo in evidenza la presenza di particolato con composizione chimica diversa (vedi Tabella I).

I risultati morfologici e chimici del campione sono mostrati nelle immagini successive. I picchi dello spettro che non riportano indicazioni dell'elemento a cui si riferiscono sono picchi secondari di un elemento già segnalato in coincidenza del picco principale.

Nota: l'elenco degli elementi nella tabella osserva il criterio di maggior rappresentatività dell'elemento nello spettro EDS. La successione degli elementi inizia da quelli con il picco EDS più alto.

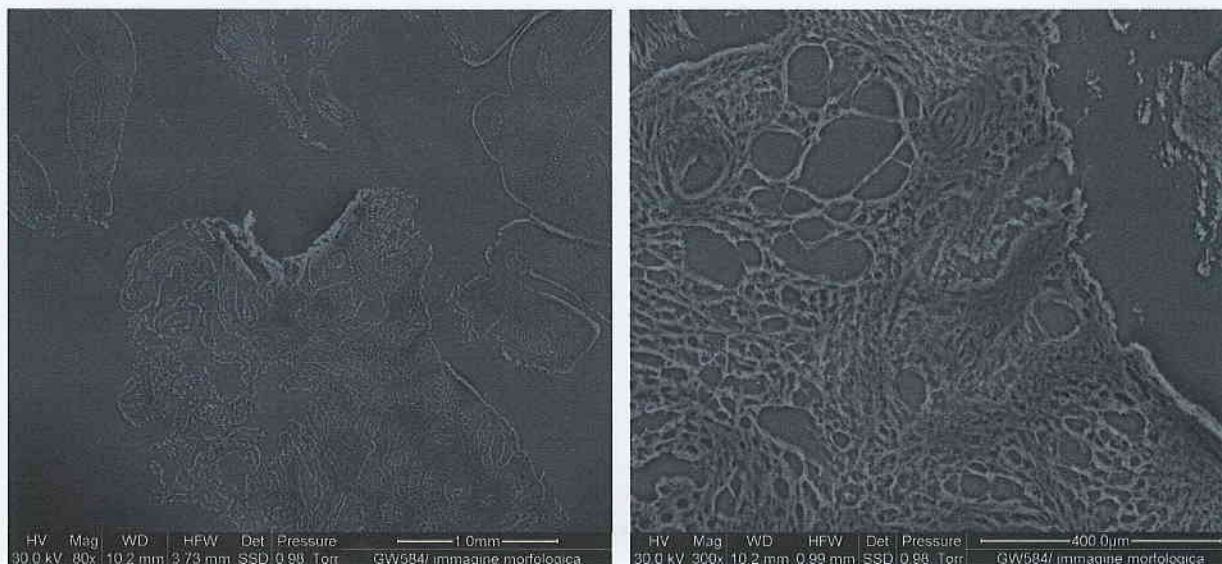
Reperto 1, vescica – neoplasia transizionale papillare di basso grado

La tabella riassume tutte le analisi più significative eseguite sul campione.

Tab. I. Analisi EDS del reperto 1.

N° Analisi	Descrizione	Elementi presenti
1	vescica	immagine morfologica
2	vescica	immagine morfologica
3	vescica	C,O,Cl,S,P,Na
4	detrito da 2 µm	C,Fe,O,Cr,Cl,Ni,P,S,Ca
5	detrito da 5 µm	C,Fe,O,Cr,Cl,Ni,P,S,Ca
	nanosferule da 0,1 µm	C,W,O,Cl,S,Ca
6	particolare di una nanosferula da 0,1 µm	C,W,O,Cl,S,Ca
7	nanosferule da 0,1 - 0,4 µm	C,W,O,Cl,S,Ca
	particolare	
8	nanosferule	C,W,O,Cl,S,Ca
	particolare	
9	nanosferula da 0,1 µm - particolare ad altissimo ingrandimento	C,W,O,Cl,S,Ca
10	nanosferule da 0,3 µm	C,W,O,Cl,S,Ca
11	nanosferule - particolare ad altissimo ingrandimento in modalità SED	C,W,O,Cl,S,Ca
12	detrito da 5 µm	S,Ca,C,O,P

Sono state trovate numerose sferule contenenti Tungsteno.



Figg. 1 e 2, Analisi 1 e 2 della tabella I. Le figure mostrano immagini morfologiche a basso ingrandimento della sezione di vescica analizzata.

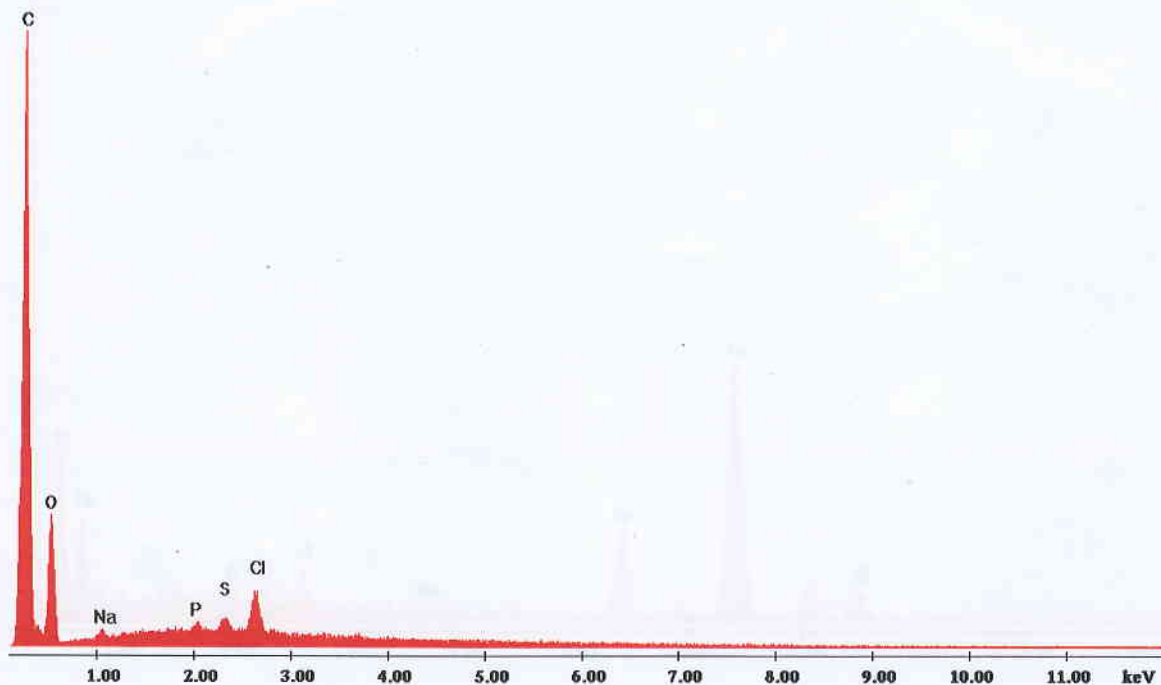
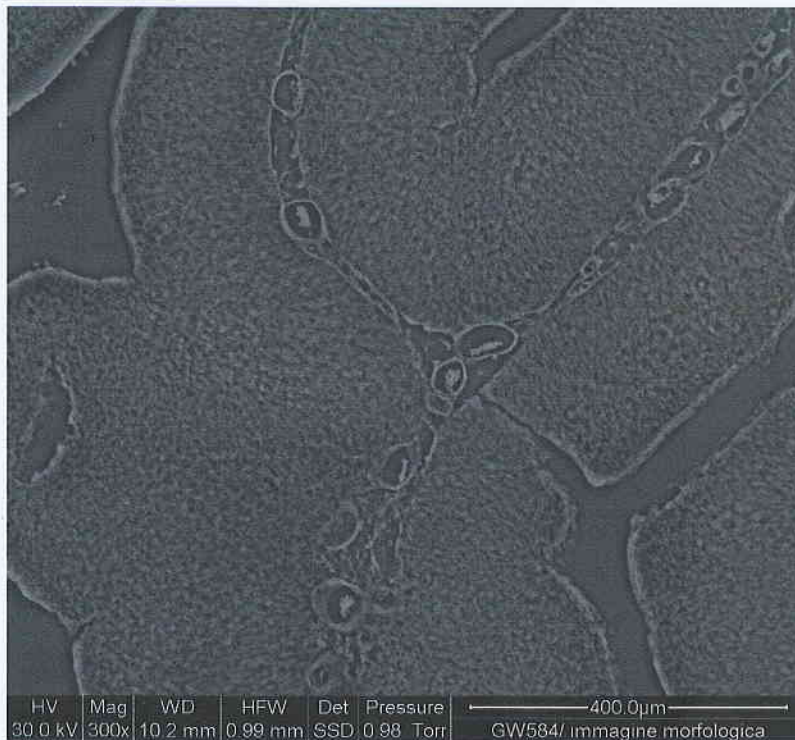


Fig. 3, Analisi 3 della tabella I. La figura mostra la morfologia a basso ingrandimento di una porzione della sezione. L'analisi chimica evidenzia la composizione del tessuto biologico normale dopo fissazione: Carbonio, Ossigeno, Cloro, Zolfo, Fosforo e Sodio. Questi sono elementi caratteristici del tessuto biologico e non verranno tenuti in considerazione nella valutazione dell'enorme quantità di corpi esogeni.

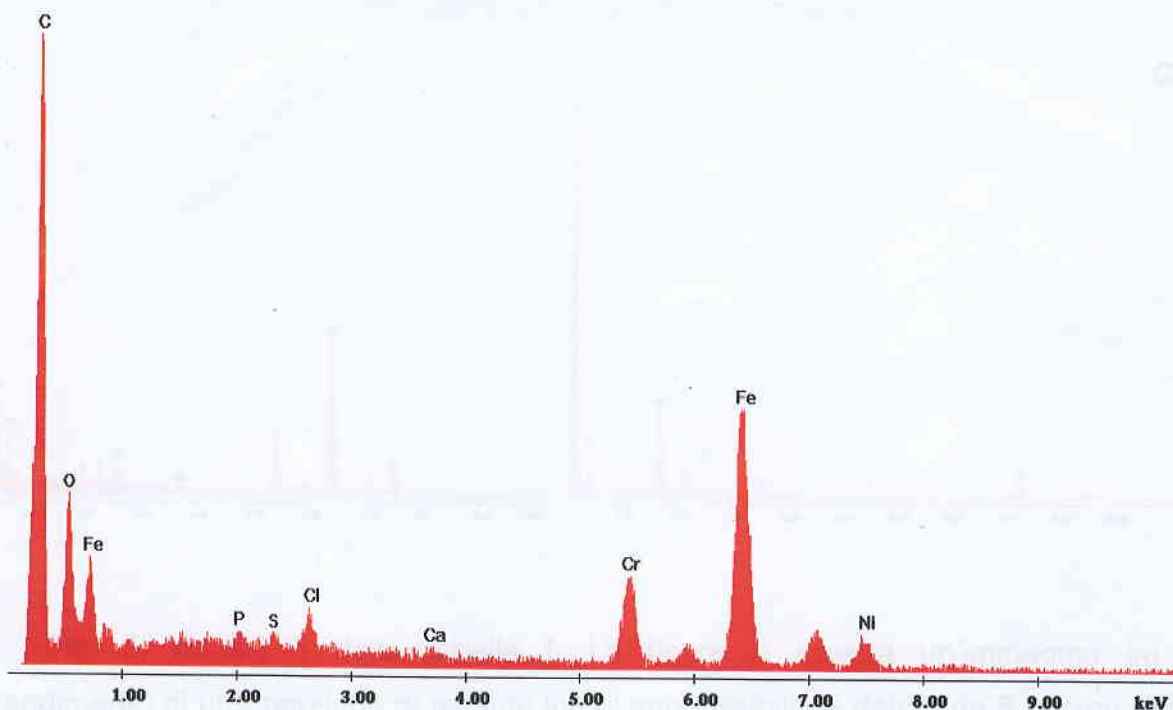


Fig. 4, Analisi 4 della tabella I. La figura mostra un'immagine ad alto ingrandimento di un detrito da 2 micron intrappolato nel tessuto analizzato. L'analisi EDS mostra che esso è composto da Carbonio, Ferro, Ossigeno, Cromo, Cloro, Nichel, Fosforo, Zolfo e Calcio. Si tratta di un detrito di acciaio di qualche micron.

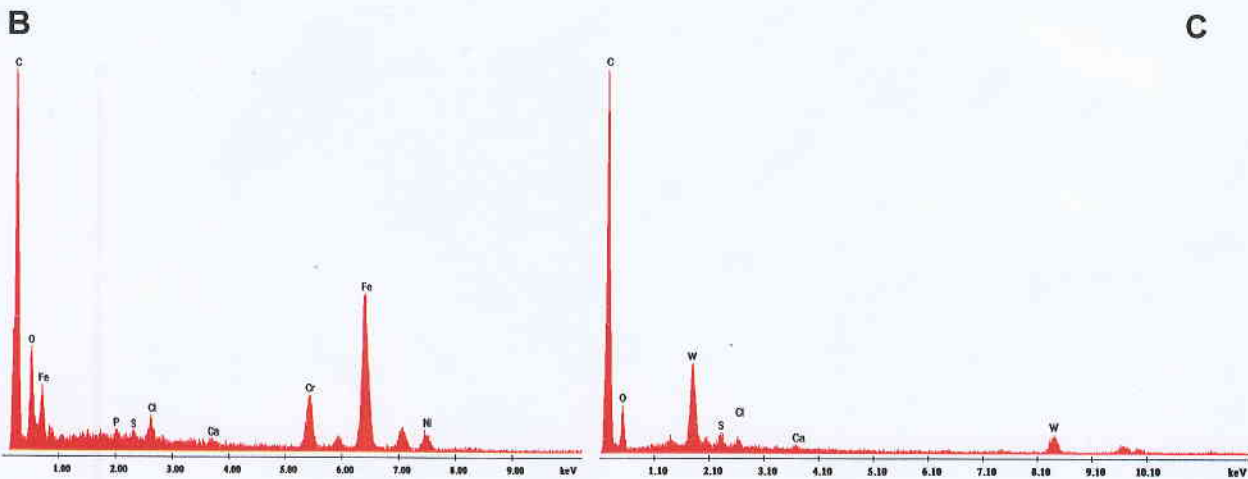
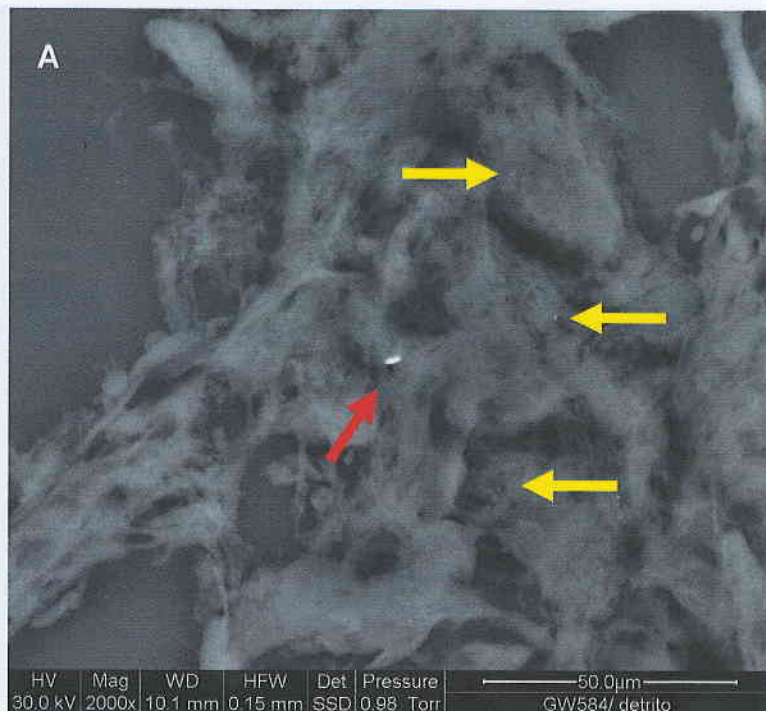


Fig. 5, Analisi 5 della tabella I. La figura A mostra un'immagine ad alto ingrandimento di una porzione di tessuto in cui sono visibili un detrito da 5 micron (freccia rossa) e numerose sferule da 0,1 micron (freccie gialle). L'analisi EDS mostra che il detrito è composto da Carbonio, Ferro, Ossigeno, Cromo, Cloro, Nichel, Fosforo, Zolfo e Calcio (Fig. B) mentre le nanosferule sono composte da Carbonio, Tungsteno, Ossigeno, Cloro, Zolfo e Calcio (Fig. C). Sono evidenti nel tessuto detriti d'acciaio e nanoparticelle di Tungsteno. Stante la metodica analitica impiegata, non è direttamente comprensibile se si tratti di poveri di Tungsteno o di carburo di Tungsteno.

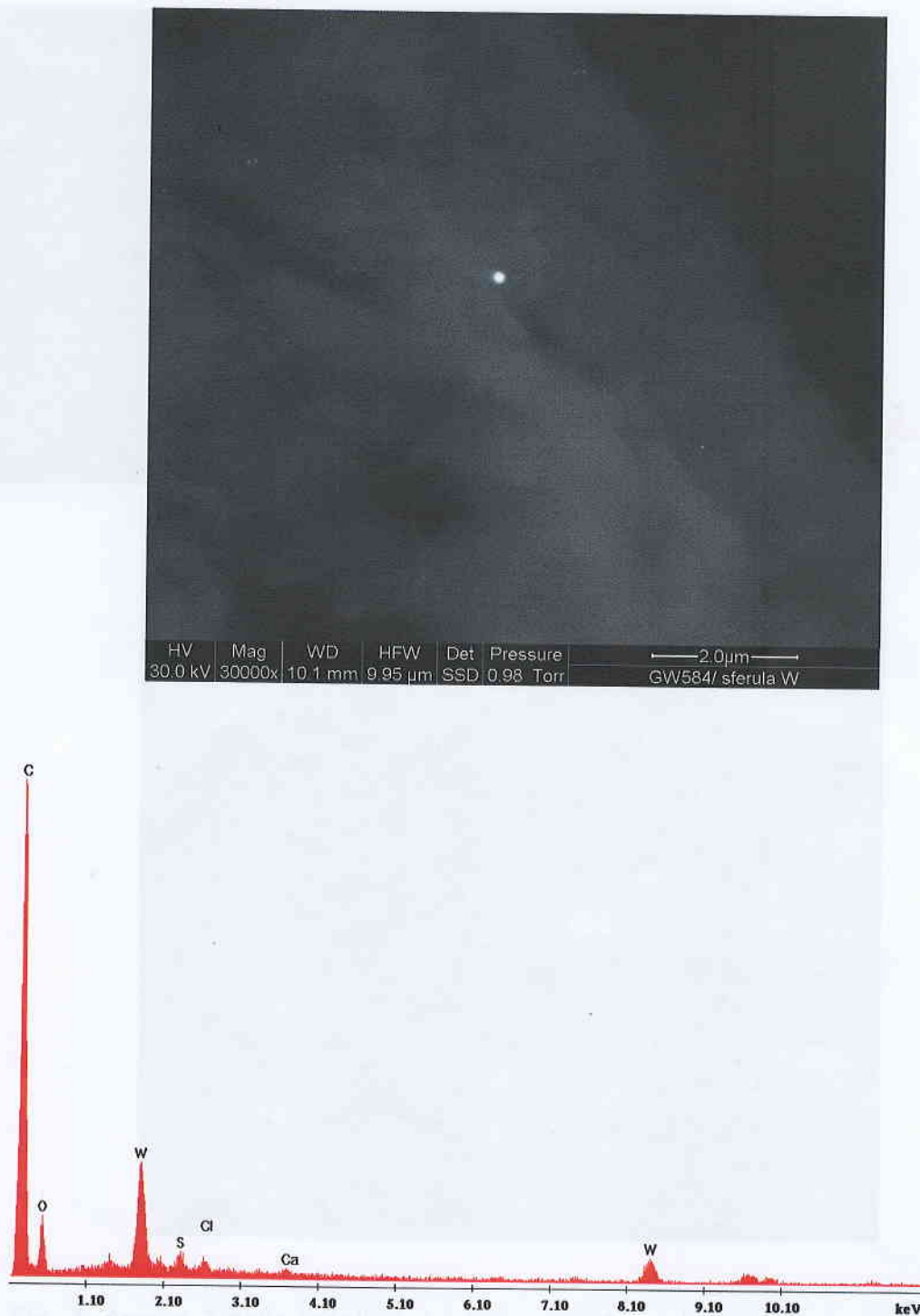


Fig. 6, Analisi 6 della tabella I. La figura mostra un particolare ad alto ingrandimento di una delle nanoparticelle perfettamente sferiche di Fig. 5, composta da Carbonio, Tungsteno, Ossigeno, Cloro, Zolfo e Calcio.

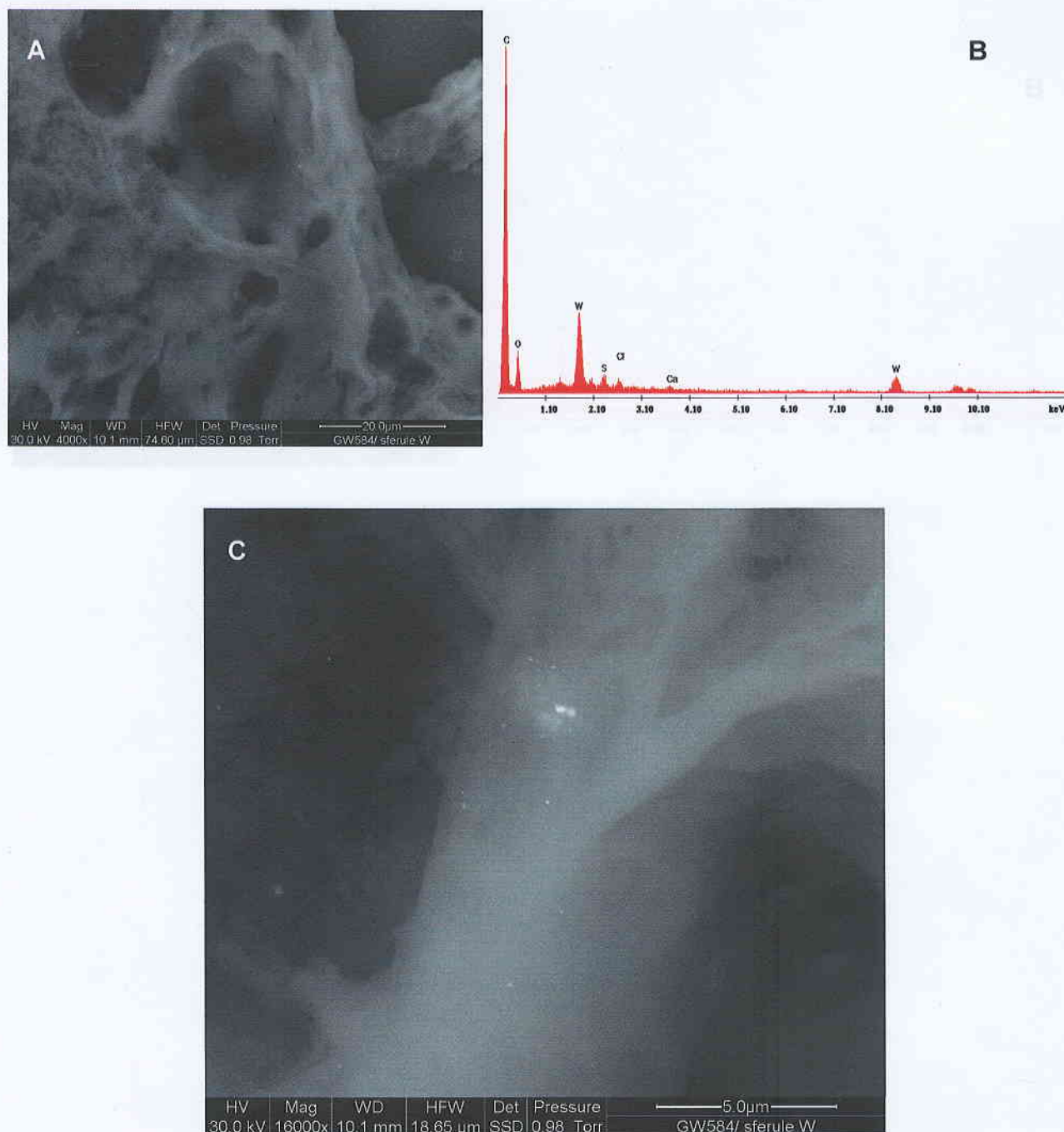


Fig. 7, Analisi 7 della tabella I. Le figure mostrano la morfologia del tessuto a due diversi ingrandimenti (Figg. A, C). A più alto ingrandimento sono apprezzabili numerose sferule nanometriche di dimensioni comprese tra 0,1 e 0,4 micron. Lo spettro EDS (Fig. B) mostra che esse sono composte da Carbonio, Tungsteno, Ossigeno, Cloro, Zolfo e Calcio.

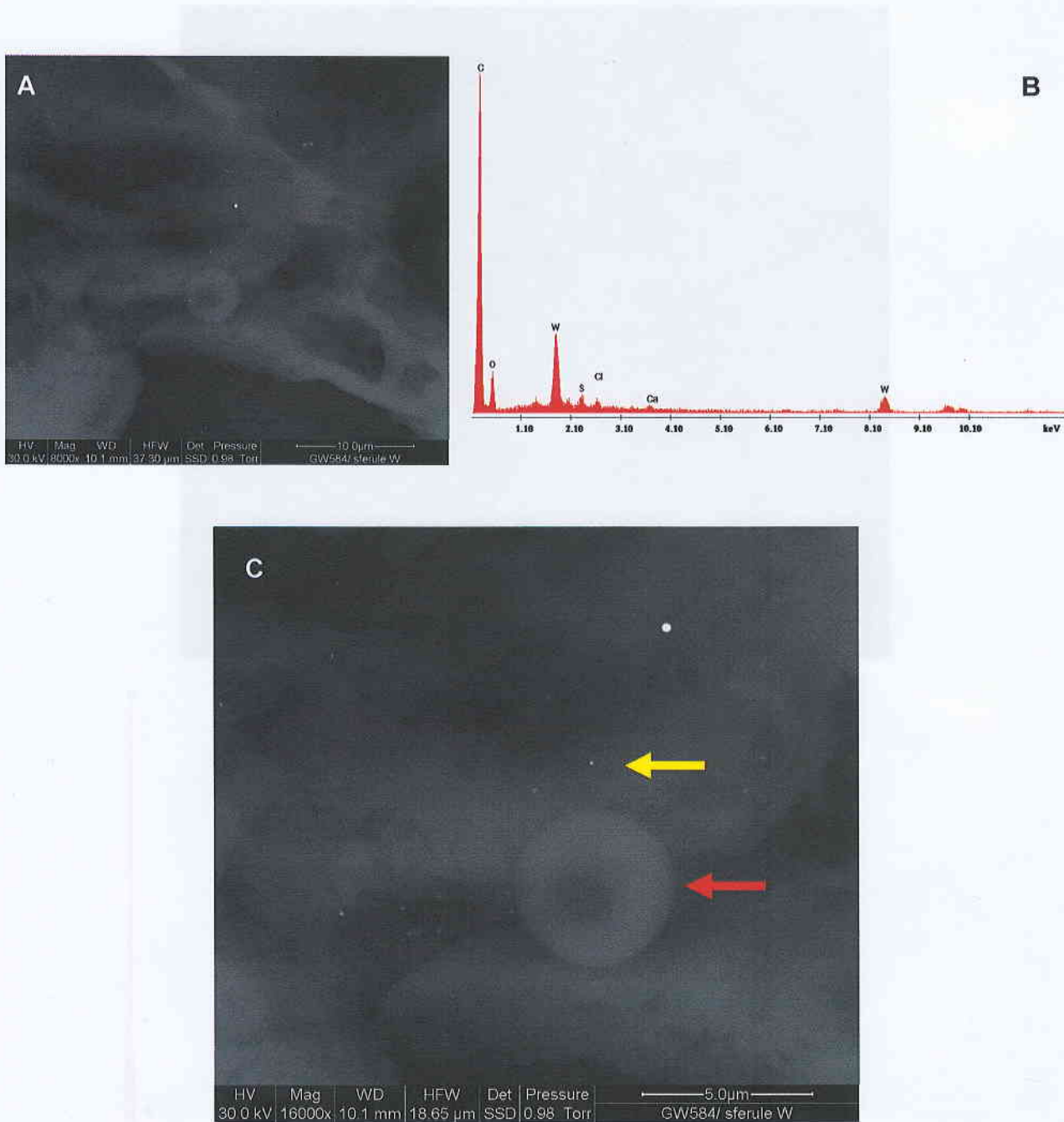


Fig. 8, Analisi 8 della tabella I. Le figure mostrano la morfologia del tessuto a due diversi ingrandimenti (Figg. A, C) in cui si nota la presenza di numerose nanosferule. Lo spettro EDS (Fig. B) mostra che esse sono composte da Carbonio, Tungsteno, Ossigeno, Cloro, Zolfo e Calcio. La freccia rossa indica un globulo rosso (circa 7 micron), mentre la freccia gialla mostra una nanoparticella. Per confronto, si noti la differenza di dimensioni.

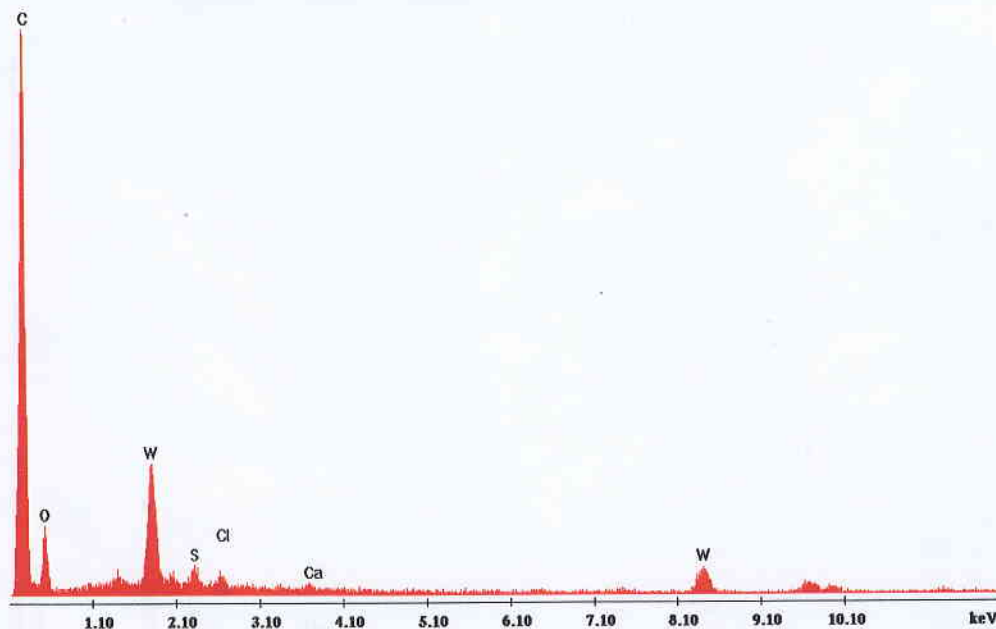


Fig. 9, Analisi 9 della tabella I. La figura mostra un particolare ad altissimo ingrandimento di una delle nanosferule di Fig. 8, composta da Carbonio, Tungsteno, Ossigeno, Cloro, Zolfo e Calcio. La particella di Tungsteno (o carburo di Tungsteno) misura circa 80 nanometri.

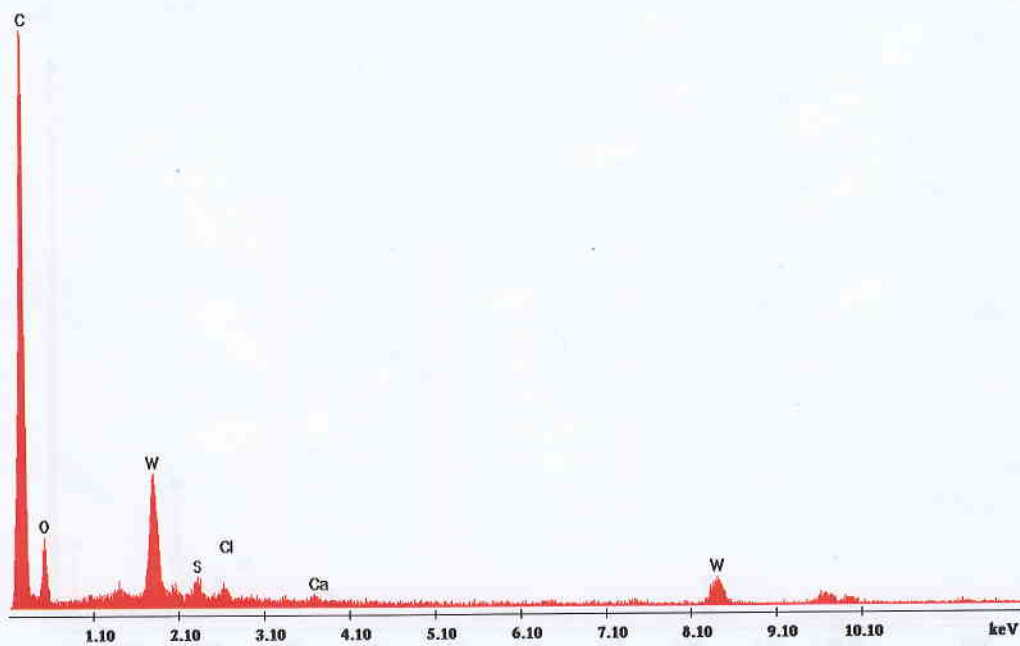


Fig. 10, Analisi 10 della tabella I. La figura mostra un'immagine morfologica ad alto ingrandimento in cui sono apprezzabili alcune sferule da 0,3 micron. Lo spettro EDS mostra che esse sono composte da Carbonio, Tungsteno, Ossigeno, Cloro, Zolfo e Calcio.

... della sferule W... (analisi EDS) ...

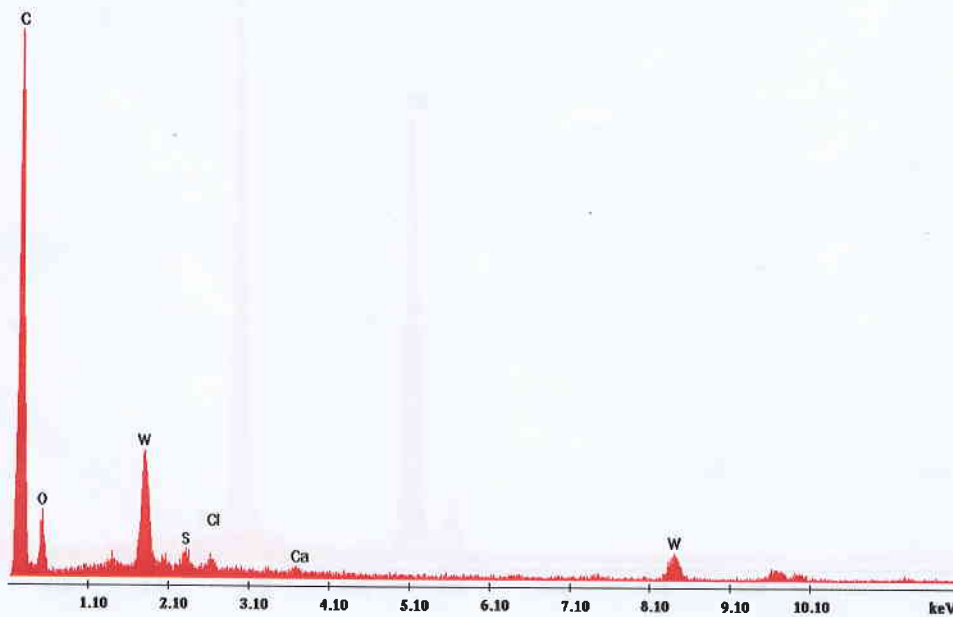


Fig. 11, Analisi 11 della tabella I. La figura mostra un particolare ad altissimo ingrandimento di una delle nanosferule di Fig. 10, composta da Carbonio, Tungsteno, Ossigeno, Cloro, Zolfo e Calcio. Questa immagini fornisce esclusivamente informazioni sulla superficie della sferula in quanto realizzata in modalità SED (elettroni secondari).

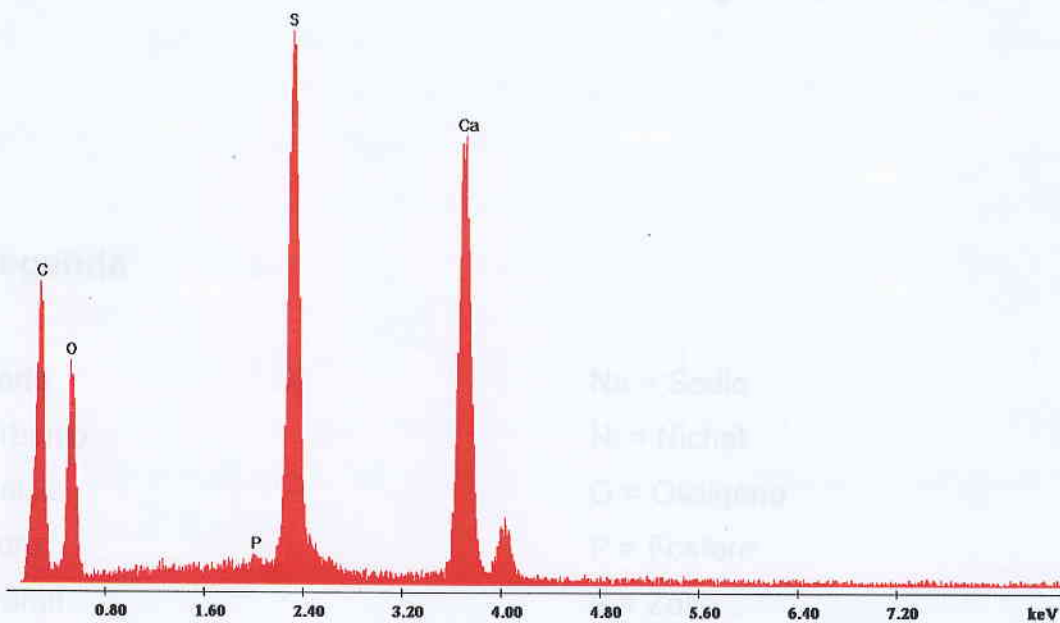


Fig. 12, Analisi 12 della tabella I. La figura mostra un particolare ad altissimo ingrandimento di un detrito da 5 micron intrappolato nel tessuto analizzato e composto da Zolfo, Calcio, Carbonio, Ossigeno e Fosforo.

6. Conclusioni

Sono stati analizzati i frammenti di tessuto tumorale asportato dalla vescica pervenutici.

Il tessuto ha mostrato la presenza di numerosissime particelle metalliche. Tranne una particella di solfato di Calcio, gli altri detriti sono d'acciaio e di Tungsteno (o carburo di Tungsteno). Queste ultime particelle sono di dimensione nanometrica.

Il paziente è stato sicuramente esposto ad un inquinamento ambientale contenente sia polveri di acciaio sia polveri contenenti Tungsteno. Le dimensioni nanometriche di queste ultime indicano come possibile origine una combustione ad altissima temperatura. Non è possibile stabilire se è l'ingresso nell'organismo delle polveri sia avvenuto per via inalatoria o per ingestione di cibi contaminati. Le polveri sono comunque passate nella circolazione sanguigna e da lì filtrate da organi emuntori come fegato e reni. La loro dimensione ridotta ha permesso un passaggio indenne fino ad arrivare in vescica dove, accumulandosi, possono aver indotto l'azione patologica. Queste polveri, comunque corpi estranei, non sono né biocompatibili né biodegradabili, e per la loro dimensione nanometrica possono esercitare un'azione deleteria nei riguardi delle cellule.

7. Legenda

Ba = Bario

C = Carbonio

Ca = Calcio

Cl = Cloro

Cr = Cromo

Cu = Rame

Fe = Ferro

K = Potassio

Mg = Magnesio

Na = Sodio

Ni = Nichel

O = Ossigeno

P = Fosforo

S = Zolfo

Sn = Stagno

W = Tungsteno

Zn = Zinco

8. Riferimenti bibliografici

- 1 - A.M. Gatti, M. Ballestri, A. Bagni, *Granulomatosis associated to porcelain wear debris*, American Journal of Dentistry 2002, 15(6): 369-372.
- 2 - E. Sabbioni, A.M. Gatti, T. Hartung 2004 *Pathology of new diseases induced by nanomaterials and in vitro toxicology research*. Pathology International 50:S141-148
- 3 - A.M. Gatti *Biocompatibility of micro- and nano-particles in the colon (part II)* Biomaterials vol.25, 3, Feb 2004 385-392
http://nano.cancer.gov/resource_center/sci_biblio_devices-machines.asp
- 4 - A.M. Gatti, S. Montanari " *Approccio bioingegneristico alla Sindrome dei Balcani*" Fisica in Medicina 2004, n.2 , 107-114.
- 5 - M. Lucarelli, E. Monari, A.M. Gatti, D. Boraschi *Modulation of defence cell function by nanoparticles in vitro*. Key Engineering Materials.2004, Vol. 254-56, 907-10 (ISBN 0-87849-932-6),
- 6 - K. Peters, R. Unger, A.M. Gatti, E. Monari, J. Kirkpatrick *Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro Studies on viability, proliferation and inflammation*, J. of Material Science: Mat. in Medicine 15 (4), 321-325, 2004.
- 7 - A.M. Gatti, S. Montanari, E. Monari, A. Gambarelli, F. Capitani, B. Parisini *Detection of micro and nanosized biocompatible particles in blood*. J. of Mat. Sci. Mat in Med. 15 (4): 469-472, April 2004 <http://dx.doi.org/10.1023/B:JMSM.0000021122.49966.6d>
- 8 - A.M. Gatti, S. Montanari *La cosiddetta sindrome dei Balcani: un approccio bioingegneristico* Fisica in Medicina N. 2/2004 aprile-giugno.
- 9 - A.M. Gatti, S. Montanari *Risk assessment of micro and nanoparticles and the human health*, Chapter of Handbook of Nanostructured biomaterials and their applications ed American Scientific Publisher USA 2005, cap. 12, 347-369.
- 10 - A.M. Gatti *Un paese contaminato* in Il fantasma in Europa di S. Divertito e L. Leone. Ed. Il segno dei Gabrielli Editori, Cap. 4.1 pag. 209-215, 2004
- 11 - S. Divertito, A. Gatti *Le nanoparticelle assassine* Capitolo n. 4 sul libro Uranio:il nemico invisibile, Infinito Edizioni, Roma, 2005
- 12 - A.M. Gatti *Uranio impoverito. Neoplasie e alte temperature. La morte a forma di sfera* la Rinascita p.117-24, Marzo 2005 ISBN 88-89602-07-4

- 13 - A.M. Gatti, S. Montanari, *Retrieval analysis of clinical explanted vena cava filters* J. of Biomedical Materials Research: Part B. 77B, 307-314, 2006 IF 2.105 (Rank 2-di 15).
- 14 - A.M. Gatti, S. Montanari, A. Gambarelli, F. Capitani, R. Salvatori *In-vivo short- and long-term evaluation of the interaction material-blood* Journal of Materials Science Materials in Medicine, 2005, 16, 1213-19
- 15 - S. Montanari, A.M. Gatti *Nanopathology and nanosafety*. Proceedings of the international School on advance material science technology VII Course, "Nanotechnologies for drug delivery and medical applications. Iesi, settembre 2005
- 16 - G. Barbolini, A.M. Gatti, *Nanopatologia*. Trattato di Istopatologia. Ed. Piccin Nuova Libreria Padova ISBN 88-299-1769-9 2006, Cap.1.5 pag 75-80
- 17 - G. Barbolini, A.M. Gatti, B. Murer, *Pleura*, Trattato di Istopatologia. Ed. Piccin Nuova Libreria Padova ISBN 88-299-1769-9 2006, Cap 8.4 pag 1081-1098 .
- 18 - K. Peters, R. Unger, A.M. Gatti, E. Sabbioni, A. Gambarelli, J. Kirkpatrick, *Impact of ceramic and metallic nanoscaled particles on endothelial cell functions in vitro*. Nanotechnologies for the life Sciences Vol.5 Nanomaterials- Toxicity, Health and Environmental Issues Ed. By Challa S.S. R. Kumar Wiley -VCH Verlag GmbH &Co. KGaA 2006. 108-129. ISBN: 3-527-31385-0, vol. 5, 108-125.
- 19 - A.M. Gatti, *L'inquinamento bellico come causa di nanopatologie* capitolo del libro "URANIO", M.I.R. Edizioni, novembre 2005 pag. 6-35, ISBN 88-88282-70X
- 20 - T. Hansen, G. Clermont, A. Alves, R. Eloy, C. Brochhausen, J.P. Boutrand, A.M. Gatti, J. Kirkpatrick, *Biological tolerance of different materials in bulk and nanoparticulate form in a rat model: Sarcoma development by nanoparticles* J. R. Soc. Interface (2006) 3, 767-775 doi:10.1098/rsif.2006.0145.
- 21 - S. Montanari, A.M. Gatti *Nanopatologie: Cause ambientali e possibilità di indagine* Ambiente Risorse salute n. 110 Settembre ottobre 2006, 18-24.
- 23 - A.M. Gatti *Le due guerre* (<http://www.francarame.it/?q=node/356>) Blog della senatrice Franca Rame
- 24 - A.M. Gatti *La guerra invisibile* (<http://www.francarame.it/?q=node/332>) Blog della senatrice Franca Rame
- 25 - A.M. Gatti *La guerra in casa* (<http://www.francarame.it/?q=node/309>) Blog della senatrice Franca Rame

-
- 26 - A.M. Gatti *La guerra di tutti* (<http://www.francarame.it/?q=node/419>) Blog della senatrice Franca Rame
- 27 – A.M. Gatti, M. Ballestri, G. Cappelli *Nanoparticles: potential toxins for the organism and the kidney?* CRITICAL CARE NEPHROLOGY, 2nd Edition, Basic Physiology, Chapter 235 :2007.
- 28 – S. Montanari *Nanopatologie, ambiente e inceneritori* – Medicina Democratica 168/172 (2007) pagg. 51-58
- 29 – S. Montanari *Il girone delle polveri sottili* Ed. Macro 2008
- 30 – A.M. Gatti, S. Montanari “Nanopathology” Ed. Pan Stanford 2007, ISBN 10-9814241008
- 31 – S. Montanari “L’insidia delle polveri sottili e delle nanoparticelle”, Ed. Macro 2007, ISBN 8875078941
- 32 – S. Montanari, A.M. Gatti *Inquinanti atmosferici, non solo tosse* – 7° Congresso nazionale dell’Associazione Italiana per lo Studio della Tosse – Bologna, 8-9 febbraio 2008
- 33 – A.M. Gatti, S. Montanari *Nanopollution: The Invisible Fog of Future Wars* – The Futurist (May-June 2008) pagg. 32-34