



Università
Ca' Foscari
Venezia

**Scuola Dottorale di Ateneo
Graduate School**

**Dottorato di ricerca
in Scienze Chimiche
Ciclo XXVII
Anno di discussione 2014**

***Titolo: Studio in vivo e in vitro delle nuove applicazioni dell'argento per
il trattamento delle ferite***

**SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE DI AFFERENZA: CHIM/01
Tesi di Dottorato di Chiara Rigo, matricola 955936**

Coordinatore del Dottorato

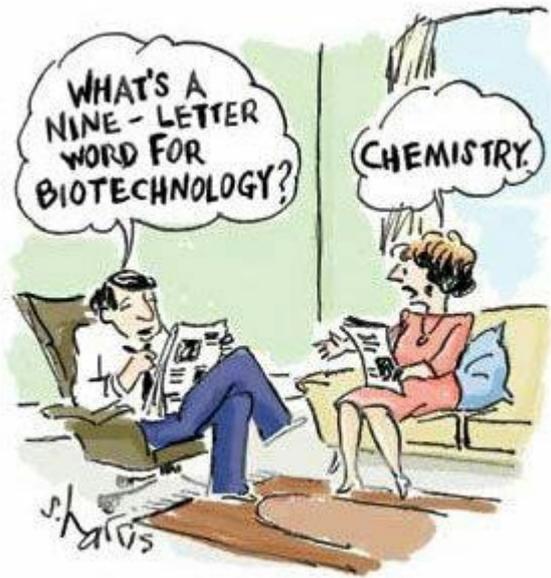
Tutore del Dottorando

Prof. Maurizio Selva

Dr. Warren R.L. Cairns

Dottoranda

Chiara Rigo



Indice

Capitolo 1	1
1.1 Argento e utilizzo dell'argento in medicina	1
1.2 Principi del processo di guarigione delle ferite	4
Capitolo 2	9
2.1 Analisi degli elementi in traccia con particolare riferimento ai tessuti biologici	9
2.1.1 Analisi elementare.....	9
2.1.2 Studio della distribuzione degli elementi in campioni biologici e tecniche di bioimaging	10
2.2 Strumentazione utilizzata.....	13
2.2.1 ICP-MS	13
2.2.2 Sistemi di introduzione del campione ad ablazione laser	15
2.2.3 Utilizzo del LA-ICP-MS nello studio della distribuzione degli elementi nei tessuti biologici.....	17
2.2.4 Principali limiti della tecnica LA-ICP-MS	18
Capitolo 3	23
3.1 Scopo del lavoro.....	23
Capitolo 4	25
4.1 Caratterizzazione strutturale delle medicazioni mediante analisi SEM-EDS.....	25
4.1.1 Parte sperimentale	26
4.1.2 Risultati e discussione	26

4.2 Determinazione della concentrazione totale di argento nelle medicazioni	28
4.2.1 Parte sperimentale	29
4.2.1.1 Preparazione dei campioni, stima dei recuperi e scelta della matrice in cui diluire i campioni per l'analisi	29
4.2.1.2 Strategie di quantificazione dell'argento	31
4.2.2 Risultati e discussione	33
4.2.2.1 Messa a punto dei metodi di mineralizzazione.....	33
4.2.2.2 Stima dei recuperi	35
4.2.2.3 Scelta della matrice in cui diluire i campioni per l'analisi.....	36
4.2.2.4 Quantificazione dell'argento totale presente nelle medicazioni	38
4.3 Conclusioni	40
 Capitolo 5.....	 41
5.1 Cinetica di rilascio dell'argento e valutazione delle alterazioni strutturali delle medicazioni	42
5.1.1 Parte sperimentale	42
5.1.1.1 Esperimenti di rilascio in soluzione	42
5.1.1.2 Caratterizzazione della microstruttura delle medicazioni mediante analisi SEM-EDS	45
5.1.2 Risultati e discussione	45
5.2 Caso di studio: quantità di argento residuo in medicazioni dopo il loro utilizzo	57
5.2.1 Parte sperimentale	59
5.2.2 Risultati e discussione	61

5.3 Conclusioni	64
Capitolo 6	67
6.1 Allestimento delle colture cellulari	68
6.2 Test MTT	70
6.2.1 Parte sperimentale	70
6.2.2 Risultati e discussione	71
6.3 Analisi morfologiche	71
6.3.1 Parte sperimentale	71
6.3.2 Risultati e discussione	72
6.4 Rilascio e valutazione della distribuzione dell'Ag mediante ICP-MS .	73
6.4.1 Parte sperimentale	73
6.4.2 Risultati e discussione	75
6.5 Conclusioni	79
Capitolo 7	81
7.1 Arruolamento dei pazienti e prelievo dei campioni	83
7.1.1 Paziente A	84
7.1.2 Paziente B	85
7.1.1 Paziente C	85
7.1.2 Paziente D	86
7.2 Studi di microscopia ottica, TEM E ESEM	86
7.2.1 Parte sperimentale	86

7.2.2 Risultati e discussione	87
7.3 Rilasci e profili di concentrazione dell'argento	93
7.3.1 Parte sperimentale	93
7.3.2 Risultati e discussione	94
7.4 Studio della distribuzione dell'argento e dello zinco nella pelle	96
7.4.1 Preparazione delle sezioni sottili, analisi mediante LA-ICP-MS e studio dei profili di concentrazione dell'argento	97
7.4.2 Valutazioni sulla qualita' del dato e sulla riproducibilita' della misura	103
7.4.3 Risultati e discussione	104
7.4.3.1 Paziente B	104
7.4.3.2 Paziente C	113
7.4.3.3 Paziente D	118
7.5 Osservazioni cliniche	123
7.6 Limiti del lavoro	124
7.7 Conclusioni	125
Capitolo 8.....	127
8.1 Conclusioni generali	127
Bibliografia.....	131
Publicazioni e partecipazione a conferenze	141
Ringraziamenti.....	143

Lista degli acronimi

AgNPs Nanoparticelle di argento

AuNPs Nanoparticelle di oro

cDMEM DMEM addizionato con SFB, penicillina e streptomina

CPS conteggi per secondo

DMEM Mezzo di coltura per fibroblasti umani (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMSO Dimetilsolfossido

EDS Rivelatore a dispersione di energia

ESEM Microscopio elettronico a scansione ambientale

GC Gas cromatografia

HPLC Cromatografia liquida ad alte prestazioni

IC Cromatografia ionica

ICC Coefficiente di correlazione intraclassa

ICP-MS spettrometria di massa induttivamente accoppiata al plasma

ICP-QMS spettrometro di massa induttivamente accoppiato al plasma con analizzatore quadrupolare

iDMSO soluzione di DMSO al 10% in isopropanolo

IMDM mezzo di coltura per cellule umane (*Iscove's modified Dulbecco's medium*)

LA Sistema di introduzione del campione ad ablazione laser

LA-ICP-MS Spettrometria di massa induttivamente accoppiata al plasma con sistema di introduzione del campione ad ablazione laser

LC Cromatografia liquida

MMP Metalloproteasi di matrice

MS Spettrometro di massa

MTT Test di funzionalità mitocondriale basato sull'utilizzo del colorante bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

ROS Specie reattive dell'ossigeno

OCT Resina per inclusione campioni da tagliare al criomicrotomo (*Optimal Cutting Temperature*)

RSD% Deviazione standard relativa percentuale

SEM Microscopio elettronico a scansione

SEM-EDS Microscopio elettronico a scansione con rivelatore a dispersione di energia

SFB Siero fetale bovino

SIMS Spettrometria di massa a ioni secondari

TMAH Tetrametilammonioiodrossido

TEM Microscopio elettronico a trasmissione

XRF Spettrometria a fluorescenza di raggi X

YAG ittrio alluminio granato

Capitolo 1

1.1 ARGENTO E UTILIZZO DELL'ARGENTO IN MEDICINA

L'argento ha simbolo Ag, peso atomico 107.8682, e in natura sono stati individuati solo due isotopi stabili: ^{107}Ag e ^{109}Ag . Gli stati di ossidazione possibili sono 0, 1, 2 [1, 2].

L'Ag è conosciuto fin dai tempi antichi e ritrovamenti avvenuti in Asia Minore indicano che il genere umano ha imparato a separare l'Ag dal piombo già agli inizi del 3000 a.C [3].

L'Ag in natura si trova sia come metallo puro, sia sotto forma di metallo grezzo in forma di argentite (Ag_2S) o di argento cloruro (AgCl) [1].

La maggior parte dell'Ag è ottenuta dalla produzione mineraria, come sottoprodotto della lavorazione dell'oro o del piombo. L'Ag è, inoltre, recuperato durante la raffinazione elettrolitica del rame. L'Ag puro (>99.9%) è caratterizzato da una lucentezza bianca e metallica. È leggermente più duro dell'oro, estremamente duttile e malleabile, ha la più elevata conducibilità termica ed elettrica e possiede la più bassa resistenza di contatto [1].

L'Ag è stabile in aria e acqua, ma si annerisce se esposto a ozono, solfuro di idrogeno o aria contenente solfuro [4]. L'Ag trova impiego in diversi ambiti: nella fotografia, in odontoiatria attraverso le amalgame dentali, nella realizzazione di contatti elettrici, batterie e inchiostri per la stampa di circuiti elettrici, nella produzione di specchi e di esplosivi quali il fulminato d'Ag. Inoltre particolari leghe sono utilizzate per la creazione di gioielleria e stoviglie [5-7].

I sali d'Ag trovano diverse applicazioni: l'argento cloruro viene utilizzato come collante per il vetro. Lo ioduro d'argento viene impiegato in agricoltura per la produzione di nuvole artificiali e per ridurre le dimensioni dei chicchi di grandine [8]. L'argento nitrato è utilizzato nella fotografia e, nel passato, è stato ampiamente usato nel trattamento di ferite, ulcere e ustioni [9]. Grazie alla sua elevata affinità per i gruppi solfuro, coloranti a base di Ag vengono comunemente impiegati in biologia per rendere visibili le proteine dopo elettroforesi su gel di poliacrilammide [10]. In microscopia i sali d'Ag vengono utilizzati per aumentare il contrasto e aumentare la visibilità di cellule e organelli [11, 12].

Le principali occasioni di esposizione all'Ag per l'uomo sono la sovraesposizione lavorativa degli operai nell'industria metallurgica [13], l'assorbimento dermico da parte dei pazienti con

ferite aperte trattate con medicazioni contenenti Ag o argento sulfadiazina [14], l'assunzione volontaria di Ag come integratore alimentare [15], l'ingerimento involontario di Ag colloidale [16, 17] che viene utilizzato per disinfettare acqua, frutta e verdura [18] in paesi quali il Messico [19]. L'Ag, inoltre, può essere ingerito indirettamente attraverso il consumo di alimenti colorati con il colorante E174, oppure attraverso il consumo di fogli d'Ag e confetti argentati utilizzati come decorazioni su torte e dolci [20, 21].

Sebbene l'Ag non sembri avere alcun ruolo biologico negli esseri umani, i suoi effetti sulla salute sono ancora oggetto di discussione. L'Ag, se ingerito in elevate quantità, può essere assorbito e trasportato dal sangue al resto del corpo [22]. Questo metallo si accumula in diversi organi, in particolare fegato, reni, milza e retina [23-25]. È stato osservato che una volta depositato nei tessuti, l'Ag provoca una colorazione grigio bluastra irreversibile che risulta più visibile nelle parti del corpo esposte alla luce solare. Questo fenomeno prende il nome di argiria nel caso si tratti di una discolorazione sistemica della pelle [26], o argiriosis se si tratta della discolorazione della cornea e della congiuntiva [27]. Le reazioni avverse appena descritte sono piuttosto rare e i dati a disposizione fino ad oggi indicano che sebbene la discolorazione cutanea sia permanente e deturpante, questa alterazione non sia tossica o nociva per la salute delle persone affette [28]. Un recente lavoro di Liu e collaboratori [29] ha spiegato l'origine dell'argiria. I ricercatori hanno dimostrato che le nanoparticelle di argento (AgNPs), una volta ingerite, si dissolvono rapidamente nell'ambiente acido dello stomaco. Gli ioni argento (Ag^+) così liberati si legano a proteine e piccole molecole, come ad esempio il glutathione, attraverso i gruppi tiolici e vengono trasportati dal circolo sanguigno ai diversi organi e tessuti del corpo umano. Nei tessuti esposti alla luce solare parte dell'Ag viene fotoredotto dall'azione dei raggi UV. La fotoreduzione provoca la deposizione di nuove particelle metalliche nella pelle dando origine, così, al fenomeno irreversibile dell'argiria. Secondo questo nuovo modello, i depositi di Ag associati all'argiria non sono dovuti alla traslocazione delle nanoparticelle, ma alla formazione *ex novo* di depositi di Ag metallico fotoredotto. Sembra, inoltre, che una successiva detossificazione di queste nanoparticelle secondarie avvenga attraverso reazioni che coinvolgono solfuri e seleniuri. L'Ag che non viene fotoredotto dai raggi UV, ma resta nel circolo sanguigno, viene escreto con le feci attraverso la via biliare. L'escrezione dell'Ag ingerito o inalato avviene in due fasi: circa l'80% dell'Ag somministrato viene escreto entro 24 ore. Questa parte rappresenta la frazione di Ag che non è stata assorbita dall'organismo. Il restante 20%, ovvero la frazione di Ag assorbita, ha un'emivita stimata (tempo di dimezzamento della concentrazione dell'Ag nel siero) di circa 50 giorni [30].

Lo studio del metabolismo dell'Ag sia nanoparticellare, sia ionico, rappresenta ancora una tematica da approfondire ed è quindi a tutt'oggi oggetto di indagine nonostante l'Ag⁺ sia stato ampiamente utilizzato fin dal Medioevo. Questo elemento veniva utilizzato in forma di argento nitrato per le sue proprietà antimicrobiche nel trattamento di ferite, ulcere e ustioni e fino alla scoperta degli antibiotici l'Ag è stato il farmaco di elezione nel campo della cura delle ferite [9]. Durante la seconda Guerra Mondiale l'utilizzo degli antibiotici è diventato una pratica comune e l'interesse per l'Ag come antibatterico è diminuito drasticamente. Sebbene gli antibiotici a tutt'oggi siano ancora farmaci di grande importanza e molto utilizzati, l'utilizzo massivo di queste molecole ha portato, già dagli inizi della loro applicazione, all'insorgenza di ceppi batterici resistenti [31]. Così l'Ag è tornato ad essere un'efficace e potente terapia alternativa nel trattamento delle ferite. Nel 1965 Moyer pubblicò un lavoro in cui riportava i risultati ottenuti attraverso il trattamento di pazienti ustionati con medicazioni imbevute con Ag nitrato allo 0.5% [32]. Nel 1967 Fox sintetizzò l'argento sulfadiazina combinando l'argento nitrato con la sulfadiazina: un antibiotico sulfamidico che era stato da poco scoperto. La sulfadiazina argentea è a tutt'oggi commercializzata nella forma di crema idrosolubile all'1% (m/m) e rappresenta ancora il prodotto più utilizzato nel mondo per il primo soccorso dei pazienti ustionati [33, 34]. Alla fine del 1990 è stata messa in commercio un'ampia varietà di medicazioni contenenti Ag. Le medicazioni sono tipicamente composte da una struttura polimerica plastica rivestita o impregnata con sali d'argento o Ag in forma nanoparticellare. Queste medicazioni sono caratterizzate da una veloce ed efficace azione antibatterica ad ampio spettro: le medicazioni attualmente commercializzate sono in grado di inibire la crescita di batteri sia Gram positivi sia Gram negativi [35-37]. Rispetto alla sulfadiazina argentea o alle medicazioni a base di argento nitrato, le nuove medicazioni contenenti Ag necessitano di essere cambiate meno frequentemente e provocano meno irritazione della struttura dermica. Questo si traduce in una riduzione del dolore provato dal paziente durante il cambio di medicazione [38, 39]. Le medicazioni contenenti Ag sono dichiarate sicure e non citotossiche [14, 40], anche se recenti studi hanno messo in evidenza la possibilità di effetti negativi sulla crescita di fibroblasti e cheratinociti [41, 42]. L'utilizzo delle medicazioni contenenti Ag di nuova generazione sembra presentare anche un ulteriore importante vantaggio: il principale effetto collaterale associato all'uso topico dell'Ag, ovvero la discolorazione bluastra della pelle, sembra sia estremamente più raro e, in ogni caso, transitorio [40, 43]. Sebbene l'efficacia antimicrobica e antivirale di queste medicazioni sia stata ampiamente dimostrata *in vitro* [44], il meccanismo di azione dell'Ag non è stato ancora completamente compreso ed è ancora oggetto di studio e discussione. È stato recentemente dimostrato che le AgNPs sono in grado

di rilasciare Ag^+ [45, 46] e che l'argento ionico agisce su diversi target cellulari, probabilmente grazie alla sua capacità di generare specie reattive dell'ossigeno (ROS) [47-49]. È stato inoltre osservato come l'argento ionico distrugga il gradiente protonico elettrochimico transmembrana e la catena di trasporto degli elettroni [29]. Questo altera la permeabilità della membrana plasmatica e determina rilascio di materiale citosolico e morte cellulare [50]. La capacità virucida dell'argento sembra, invece, essere dovuta all'interazione tra l'argento ionico e alcune proteine virali [44, 51-53].

La resistenza all'argento nitrato e all'argento sulfadiazina è stata documentata per la prima volta nel 1966 e le prime ipotesi sul meccanismo di resistenza all'argento ionico sono state formulate nel 2003 [54]. Nei batteri Gram negativi la resistenza all'argento ionico sembra sia determinata dalla presenza di un sistema di proteine pompa in grado creare un flusso di ioni Ag^+ tra la membrana interna e la membrana esterna dei microorganismi. I geni codificanti le proteine che danno origine al sistema di pompaggio dello ione Ag^+ verso l'esterno della cellula sono stati isolati e studiati per la prima volta nel batterio *Salmonella thyphimurium* all'interno del plasmide pMG101. Poiché i geni codificanti le proteine che conferiscono resistenza all'Ag si trovano su un plasmide, la resistenza all'Ag può facilmente propagarsi anche ad altri batteri, come già osservato da Woods e collaboratori [55]. I plasmidi, infatti, sono strutture genetiche dotate di replicazione autonoma ed indipendente dal resto della cellula, e sono in grado di spostarsi da una cellula all'altra. Recentemente è stato ipotizzato che l'utilizzo massivo di prodotti per la cura del corpo e di prodotti di uso comune contenenti argento ionico o nanoparticellare possano favorire la diffusione della resistenza batterica all'Ag [56, 57].

1.2 PRINCIPI DEL PROCESSO DI GUARIGIONE DELLE FERITE

La pelle è l'organo più grande nel corpo umano e rappresenta circa il 10% del peso totale del corpo. La cute svolge ruoli fondamentali quali la protezione contro l'ambiente esterno, l'omeostasi dei fluidi, il rilevamento sensoriale, ed è in grado di autorigenerarsi e guarire [58]. Dal punto di vista anatomico la pelle è composta da due tessuti diversi: l'epidermide e il derma, separati dalla membrana basale. Il tessuto più esterno, l'epidermide, è un epitelio multistrato appiattito composto da cheratinociti che si originano dallo strato basale ed emigrano verso la superficie della pelle. La funzione dell'epidermide è quella di mantenere l'integrità anatomica della pelle e agire come una barriera contro agenti esterni che possono esercitare effetti dannosi sul corpo. Diversamente il derma è un tessuto caratterizzato da

poche cellule e composto prevalentemente da matrice extracellulare. La matrice extracellulare è una struttura il cui principale costituente è il collagene, è caratterizzata dalla presenza di elastina, acido ialuronico e glicosamminoglicani, e rappresenta l'elemento distintivo del tessuto connettivo. Le cellule più presenti nel derma sono i fibroblasti. Tra le funzioni esercitate da queste cellule c'è la generazione della maggior parte della matrice extracellulare e il mantenimento della stessa. Il ruolo del derma è quello di fornire resistenza ed elasticità alla pelle e supportare l'estensiva vascolarizzazione, il sistema linfatico e i fasci di assoni dei nervi [59].

Viene definita ferita un danno ad un tessuto vivente che comporta una rottura o una discontinuità nell'epitelio. Le ferite possono verificarsi sia nei tessuti molli come la pelle o l'intestino, sia nei tessuti duri come le ossa o le cartilagini e possono essere provocati da cause esterne (traumi, compressioni, ustioni) o da cause interne (disordini metabolici). Il processo di guarigione di una ferita è una cascata ordinata di eventi che portano alla riparazione del tessuto danneggiato ed eventualmente alla sua sostituzione. Lo scopo finale del processo di guarigione delle ferite non è solamente la ricostruzione del tessuto danneggiato, ma anche il recupero della sua completa funzionalità, con la minima formazione di tessuto cicatriziale.

Alterazioni nel processo di guarigione e deviazioni dal percorso normale comportano una riparazione insufficiente o eccessiva del tessuto. Indipendentemente dal tessuto coinvolto, il processo di guarigione si realizza sempre attraverso una serie di eventi molecolari, biochimici e cellulari che possono essere raggruppati in tre fasi parzialmente sovrapposte: la fase infiammatoria, la fase proliferativa e la fase di rimodellamento [60].

L'infiammazione comincia spontaneamente negli istanti successivi al danno e si protrae per un tempo compreso tra 1 e 4 giorni. Questa fase è caratterizzata dalla coagulazione del sangue nel sito della ferita e dalla formazione di una iniziale barriera emostatica il cui compito è proteggere i tessuti esposti. La barriera è costituita da piastrine e proteine del sangue intrappolate in una rete di fibrina, e agisce come un'impalcatura negli eventi cellulari successivi. L'aggregato di fibrina, infatti, viene utilizzato come una guida per indirizzare verso la ferita le cellule coinvolte nel processo di riparazione quali piastrine, monociti, granulociti, fibroblasti, cellule endoteliali e cheratinociti. L'aggregato di fibrina, inoltre, rappresenta una riserva localizzata di citochine e fattori di crescita che vengono rilasciati dalle piastrine [61-65]. Un elemento chiave nella formazione dell'aggregato di fibrina è la trombina: un enzima ematico responsabile della conversione del fibrinogeno in fibrina, un evento essenziale per l'aggregazione delle piastrine che formano il tappo piastrinico. La trombina, inoltre, è necessaria nell'attivazione di altri fattori emostatici, svolge un ruolo cruciale in tutti gli eventi

che portano ad incrementare la permeabilità vascolare e promuove la migrazione delle cellule del sistema immunitario verso il tessuto danneggiato. Durante la fase infiammatoria alcune cellule del sistema immunitario vengono reclutate e migrano verso la ferita. Il processo coinvolge dapprima la migrazione di neutrofili, seguita immediatamente dalla migrazione dei macrofagi e, successivamente, dei linfociti. Tutte queste cellule prendono parte nel complesso e fondamentale processo di pulizia della ferita. Nel sito della ferita, infatti, la continuità della pelle, quindi della barriera fisiologica, è interrotta. L'apertura va chiusa il prima possibile per ridurre l'ingresso dei batteri, e i microrganismi già presenti devono essere eliminati per ridurre il rischio di infezioni. La matrice extracellulare danneggiata o lacerata deve essere rimossa e rapidamente sostituita con una nuova. Il processo di eliminazione naturale del tessuto lacerato, devitalizzato o infetto per migliorare la salute del tessuto residuo, prende il nome di sbrigliamento. L'eliminazione dei microrganismi e del tessuto necrotico hanno luogo attraverso processi di fagocitosi, attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno, e il rilascio di enzimi litici quali l'elastasi polimorfonucleare e le metalloproteasi di matrice, MMP. Le MMPs sono delle endopeptidasi zinco-dipendenti e ad oggi comprendono 24 proteine [66, 67]. La famiglia enzimatica delle MMPs è accumulata da una struttura a domini altamente conservata. Le MMPs sono in grado di degradare tutti i tipi di proteine presenti nella matrice extracellulare grazie all'azione dello ione zinco, che si trova all'interno del sito attivo nel dominio catalitico. Un aumento della concentrazione tissutale di MMPs è generalmente associato alla presenza di un processo infiammatorio in atto [68, 69].

La fase infiammatoria deve essere strettamente limitata nel tempo, poiché un prolungamento di questa condizione porta ad un incremento delle dimensioni della ferita e al danneggiamento dei tessuti sani circostanti a causa di un'attività eccessiva degli enzimi proteolitici. L'eccessiva azione dell'elastasi, per esempio, determina una riduzione considerevole nella quantità di fattori di crescita e inibitori delle proteasi, lasciando le MMPs libere di tagliare collagene, elastina e fibronectina. Questa azione incontrollata porta alla distruzione della matrice extracellulare, alla cronicizzazione della ferita o ad un ritardo nell'avvio della fase di proliferazione [70, 71]. Poiché la fase infiammatoria è il primo passo nella cascata di eventi che portano alla guarigione della ferita e una guarigione completa dipende strettamente da una conclusione positiva di questa fase, un grande sforzo è stato fatto per sviluppare terapie basate su nanotecnologie in grado di modulare la fase infiammatoria. Un'estensiva descrizione delle terapie nanotecnologiche sviluppate a partire dal 1980 per modulare il processo di guarigione, e in particolare la fase infiammatoria, sono riportate nel capitolo "*Nanoparticle Therapies for Wounds and Ulcer Healing*" del libro "*Nanomedicine in Drug Delivery*" [72]. In

questo capitolo, inoltre, viene dato molto risalto alle proprietà antibatteriche dell'Ag nanoparticellare e a come questo venga utilizzato per ridurre la contaminazione di ferite e ustioni e promuovere la guarigione delle lesioni.

La fase proliferativa è parzialmente sovrapposta alla fase infiammatoria e si svolge prevalentemente tra il quarto e il ventunesimo giorno dopo il ferimento. Il primo evento di questa fase è rappresentato dal processo di riepitelizzazione, che inizia già ventiquattro ore dopo la formazione della ferita. In questa fase i cheratinociti presenti ai bordi della ferita sono stimolati dal rilascio di alcuni fattori di crescita a produrre specifiche MMPs in grado di degradare la matrice extracellulare [73]. I cheratinociti, inoltre, rilasciano altri fattori che degradano la fibrina e che sono necessari per creare un passaggio tra il derma e l'aggregato di fibrina [74]. Indicativamente, quattro giorni dopo la ferita, i macrofagi, i fibroblasti e le cellule endoteliali si muovono verso il letto della lesione dove formano il tessuto di granulazione: un tessuto altamente vascolarizzato che chiude la discontinuità creata dalla ferita [60]. I fibroblasti vengono stimolati a invadere il sito della ferita e a produrre i componenti della nuova matrice extracellulare. Ne risulta che i cheratinociti iniziano a migrare e proliferare, formando un epitelio che avanza sopra il derma. Una volta che la barriera epidermica è stata ristabilita, la migrazione dei cheratinociti si ferma e le cellule epiteliali iniziano la fase proliferativa vera e propria.

I macrofagi rilasciano diversi fattori di crescita che stimolano l'infiltrazione dei fibroblasti. I fibroblasti così attivati, invadono il sito della lesione e producono i nuovi componenti della matrice extracellulare quali l'elastina, i glicosamminoglicani e il collagene di tipo III. Questi componenti formano una matrice di tessuto connettivo amorfa e simile a un gel, che consente la migrazione delle cellule coinvolte nella ricostruzione del tessuto. I fibroblasti, inoltre, secernono dei fattori di crescita che, uniti a quelli secreti dalle piastrine e dai neutrofili durante la fase infiammatoria, promuovono la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali [75]. Tale processo promuove la vascolarizzazione della zona. La formazione di nuovi vasi è, infatti, necessaria per fornire l'ossigeno e i nutrienti richiesti per la sintesi, la deposizione e l'organizzazione di una nuova matrice extracellulare. Successivamente, alcuni dei fibroblasti verranno convertiti in miofibroblasti, cellule contrattili che facilitano la chiusura della ferita [76, 77].

L'ultima fase, che generalmente comincia mentre la fase proliferativa è ancora in atto e può durare fino ad un anno, è la fase del rimodellamento. Il tessuto di granulazione che si è formato inizialmente nella fase di proliferazione viene trasformato in un tessuto cicatriziale stabile, più organizzato, meno vascolarizzato e caratterizzato da buone proprietà meccaniche.

La fase di rimodellamento è associata all'apoptosi dei miofibroblasti, delle cellule endoteliali e dei macrofagi, e questo determina la formazione di un tessuto cicatriziale quasi completamente privo di cellule [78]. Durante il suo percorso verso un tessuto maturo, la cicatrice diventa meno rossa, e questo riflette una riduzione della densità dei capillari nell'area [79]. Allo stesso tempo i componenti della matrice extracellulare vengono modificati attraverso un meccanismo bilanciato di proteolisi e di secrezione della nuova matrice. In particolare, il collagene di tipo III che era stato provvisoriamente depositato viene gradatamente sostituito dal collagene di tipo I [80]. La degradazione del collagene nella ferita è diretta dall'azione di diverse MMPs, e l'attività di questi enzimi è bilanciata dalla presenza di particolari inibitori detti inibitori tissutali delle metalloproteasi. Le nuove fibre di collagene sono ridisposte in una struttura più organizzata che continua progressivamente ad aumentare la resistenza alla trazione nella zona della ferita. Se considerata sul lungo termine (indicativamente 6 mesi dalla lesione), la resistenza alla trazione raggiunge solamente l'80% della resistenza tipica del derma nativo e, purtroppo, nel sito leso il valore naturale non viene mai ripristinato [79]. Un'altra caratteristica tipica della cicatrice matura è l'assenza di fanere, cioè bulbi piliferi, ghiandole sebacee e ghiandole sudoripare [81].

Il processo di guarigione delle ferite è, quindi, un percorso complesso e delicato. Fattori locali o sistemici possono alterare le tre fasi del processo portando a una guarigione non efficace. Per esempio, un'infezione della ferita può portare ad un'eccessiva e prolungata infiammazione, e questo ostacola la progressione verso la fase proliferativa. Se il metabolismo cellulare è limitato a causa di condizioni sistemiche, la fase proliferativa può a sua volta essere colpita negativamente, portando alla cronicizzazione della ferita. Le ferite croniche spesso determinano la perdita totale o parziale della funzionalità del tessuto, aumento del dolore e una riduzione nella qualità di vita per i pazienti, oltre a rappresentare una fonte notevole di spesa per le risorse del sistema sanitario. Al contrario, cicatrici ipertrofiche o cheloidi possono avere origine nel caso in cui si verifichi un'eccessiva proliferazione del tessuto o problemi durante il processo di rimodellamento [82]. Non stupisce, quindi, che la comprensione degli eventi cellulari, molecolari e biochimici che regolano il processo di guarigione delle ferite rappresenti un'affollata tematica di studio e indagine scientifica. Attualmente molti progetti di ricerca sono finalizzati alla comprensione di come sia possibile indirizzare questo percorso attraverso l'utilizzo di farmaci e chemioterapici, basati anche sull'applicazione di terapie nanotecnologiche.

Capitolo 2

2.1 ANALISI DEGLI ELEMENTI IN TRACCIA CON PARTICOLARE RIFERIMENTO AI TESSUTI BIOLOGICI

2.1.1 ANALISI ELEMENTARE

Le procedure per la preparazione dei campioni per analisi elementare dipendono strettamente dalla natura del campione e sono, generalmente, abbastanza semplici. La strumentazione utilizzata in questo progetto di ricerca, la spettrometria di massa induttivamente accoppiata al plasma (ICP-MS), è stata inizialmente sviluppata per l'analisi di elementi in tracce e ultratracce in campioni liquidi [83]. Pertanto, se il campione da analizzare si trova già allo stato liquido, come per esempio nel caso di campioni di acqua, generalmente è sufficiente effettuare una filtrazione prima dell'analisi, al fine di rimuovere eventuali particelle in sospensione che potrebbero occludere il nebulizzatore capillare o depositarsi nell'iniettore.

Diversamente, se il campione è allo stato solido, deve essere mineralizzato prima di poter essere analizzato. Questo passaggio rappresenta probabilmente la fase più cruciale di tutta l'analisi: infatti, maggiore è la manipolazione che il campione deve subire, maggiore è il rischio che avvengano contaminazioni accidentali [84].

Sebbene non esista un protocollo universalmente valido per la mineralizzazione dei campioni solidi, la digestione viene generalmente effettuata utilizzando acidi minerali forti (HNO_3 , HCl , HF) e agenti ossidanti (H_2O_2) ad elevate temperature. Nella maggior parte dei casi si ricorre all'uso di mineralizzatori a microonde per ridurre il tempo di processamento e per evitare possibili perdite di analita. Il processo di mineralizzazione porta alla completa dissoluzione della matrice e viene generalmente condotto utilizzando reagenti di grado il più elevato possibile per limitare il rischio di contaminazioni [83, 84].

Nel caso si debba mineralizzare un campione con un elevato contenuto di materia organica, come ad esempio durante l'analisi delle medicazioni contenenti Ag che sono caratterizzate dalla presenza una componente plastica, l'utilizzo del forno elettrico a muffola [85, 86] può dimostrarsi efficace e semplificare la successiva mineralizzazione con acidi forti. Il trattamento termico a elevate temperature, infatti, carbonizza la materia organica e rende il campione più facilmente aggredibile dall'azione degli acidi. In alcuni casi può risultare utile utilizzare solventi organici (toluene, n-esano, dimetilsolfossido) per solubilizzare la componente polimerica prima

di procedere alla mineralizzazione acida [86]. Sebbene molti metodi siano stati sviluppati per la mineralizzazione e la decomposizione di diverse matrici polimeriche [87-90], la messa a punto della metodica analitica e la scelta delle condizioni operative ottimali dipendono strettamente dal campione che si deve analizzare.

Nel caso in cui l'obiettivo sia lo studio della speciazione di un elemento è, invece, necessario utilizzare condizioni meno aggressive rispetto a quelle finora descritte, al fine di preservare le specie presenti nel campione e garantire che il loro stato di ossidazione resti inalterato.

Una situazione particolare è rappresentata dalla mineralizzazione del sangue e dei tessuti biologici. In questo caso è preferibile, se la stabilità degli analiti lo consente, utilizzare strategie di mineralizzazione basica: il reagente più utilizzato in quest'ambito è il tetrametilammonio idrossido (TMAH) [91-94]. Il TMAH è in grado di mineralizzare completamente i tessuti biologici anche utilizzando piccoli volumi e applicando condizioni blande: questo reagente viene di solito impiegato a pressione atmosferica e a temperature inferiori ai 70 gradi centigradi. Altri reagenti utilizzati per facilitare la dissoluzione dei tessuti biologici sono l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) [93], l'idrossido di ammonio e i surfattanti non ionici (il più usato è il Triton X-100). Questi ultimi due reagenti facilitano la solubilizzazione delle proteine, in particolare le proteine transmembrana, e attraverso la formazione di micelle solubilizzano i lipidi [95]. Una completa solubilizzazione delle componenti del campione è altamente auspicabile quando si effettuano analisi ICP-MS: in questo modo si riduce, infatti, il rischio di occlusione del nebulizzatore capillare e la deposizione di particelle nell'iniettore [96].

2.1.2 STUDIO DELLA DISTRIBUZIONE DEGLI ELEMENTI IN CAMPIONI BIOLOGICI E TECNICHE DI BIOIMAGING

Gli elementi in traccia giocano un ruolo essenziale negli organismi viventi. Molte proteine, infatti, contengono al loro interno metalli. Questi possono avere un ruolo strutturale e, quindi, consentire di mantenere la forma e la struttura tridimensionale della proteina, come ad esempio nei motivi a dito di zinco, oppure possono svolgere un ruolo funzionale come nel caso degli ioni presenti nel sito attivo dei metalloenzimi. L'omeostasi dei metalli è, quindi, vitale per il benessere degli organismi e, pertanto, è altamente regolata attraverso l'attività di trasportatori di membrana e proteine intracellulari che guidano il metallo verso bersagli specifici, quali cofattori o metalloenzimi. L'analisi degli elementi in traccia in organi, tessuti o in cellule fornisce informazioni chiave nella comprensione di molti processi biologici quali, ad esempio, lo sviluppo di malattie come il morbo di Alzheimer [97] e il morbo di Parkinson [98]. In queste due patologie, infatti, è stata osservata una distribuzione anormale dei metalli di

transizione nel tessuto cerebrale [99]. Oltre allo studio dei metalli naturalmente presenti nelle cellule e nei tessuti, l'analisi degli elementi in traccia può essere importante per studiare l'assorbimento e la distribuzione degli xenobiotici, oppure per identificare se gli organismi viventi sono sottoposti a contaminazione da parte dell'ambiente. Ad esempio, lo studio della contaminazione da arsenico e mercurio nei prodotti ittici è stato oggetto di numerosi studi [100, 101].

Sebbene molte informazioni possano essere ottenute attraverso la digestione del tessuto e la misurazione della concentrazione totale degli elementi di interesse, determinare la distribuzione spaziale degli analiti nel campione può aggiungere dettagli fondamentali all'indagine. Recentemente è stata studiata la distribuzione del mercurio in organismi modello acquatici [102] e la distribuzione di torio, uranio e plutonio in campioni di tessuto polmonare e linfonodi prelevati da persone esposte lavorativamente a questi metalli [103].

Le diverse tecniche di *bioimaging* sono descritte in modo estensivo nel lavoro di McRae [104]. Le prime tecniche messe a punto per visualizzare la distribuzione dei metalli all'interno dei tessuti erano colorazioni istologiche che venivano osservate attraverso la microscopia ottica. Sebbene queste tecniche siano state ampiamente utilizzate, presentavano diversi svantaggi. Le tecniche di colorazione, infatti, non sono sufficientemente sensibili per poter rilevare elementi presenti in tracce o ultratracce [105] e, considerato il meccanismo di azione dei coloranti, queste tecniche non sono adatte alla quantificazione totale degli analiti [106]. I metodi di colorazione utilizzati, inoltre, sono specifici per ogni singolo elemento e, quindi, non è possibile visualizzare la distribuzione di più elementi nella stessa sezione. Ulteriori tecniche di *bioimaging* impiegate finora sono state la microscopia ottica a fluorescenza, che consente di utilizzare piccole molecole organiche somministrabili anche a organismi viventi e che per questo motivo è stata ampiamente utilizzata nello studio dei flussi a livello cellulare [104, 107], e le analisi basate sulla spettrometria a fluorescenza di raggi X (XRF) [104]. Sono state impiegate anche tecniche di *imaging* a risonanza magnetica e di tomografia a emissione di positroni, sebbene i principali limiti di questi approcci sia la limitata risoluzione spaziale raggiungibile e la possibilità di ottenere solamente risultati qualitativi [104]. L'utilizzo dell'autoradiografia in seguito alla somministrazione di particolari radioisotopi è stato sfruttato per lo studio dell'assorbimento di zinco, manganese e ferro nel cervello [108-112]. Un'altra tecnica che è stata ampiamente utilizzata per visualizzare la distribuzione di Bi [113], Zn [114, 115], Au [116], Ag [117] e Hg [118] è l'autometallografia [104]. Come nel caso dell'autoradiografia, anche l'autometallografia risente del limite di essere applicabile ad solo un elemento per analisi, e questo è in contraddizione con la necessità di ottenere più

informazioni possibile dallo stesso campione biologico. Inoltre, questo limite rende impossibile utilizzare le due tecniche nello studio dell'interazione tra metalli. La spettrometria di massa a ioni secondari (SIMS) sfrutta l'utilizzo di un fascio di ioni per effettuare analisi di superficie nei campioni. Il fascio di ioni primari determina la formazione di ioni secondari che vengono emessi dal campione e che sono poi analizzati da uno spettrometro di massa, consentendo così di eseguire sia analisi multielementari, sia isotopiche. Questa tecnica di analisi può raggiungere una risoluzione spaziale nel range dei nanometri e limiti di rivelabilità di pochi $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ [104]. Nonostante gli indubbi vantaggi, questa tecnica presenta anche dei limiti consistenti quali la necessità di una preparazione laboriosa dei campioni, il numero limitato di strumenti operativi nel mondo e il fatto che questa tecnologia non è ancora ben consolidata nell'analisi di campioni biologici [119].

La spettrometria di massa induttivamente accoppiata al plasma (ICP-MS) accoppiata a un sistema di introduzione del campione ad ablazione laser (LA-ICP-MS) è una tecnica che è stata ampiamente utilizzata nell'analisi di campioni biologici con diversa origine. La risoluzione spaziale ottenibile è nell'ordine dei micrometri e i limiti di rivelabilità per la maggior parte degli elementi sono di pochi $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$. La strumentazione LA-ICP-MS presenta un costo inferiore rispetto alla strumentazione SIMS, è meno complicata da utilizzare e, essendo la strumentazione ICP-MS molto più diffusa su scala mondiale, sussiste il potenziale per un suo ampio utilizzo [120].

L'impiego di tecniche di *bioimaging*, dunque, fornisce elementi importanti per lo studio e la comprensione di processi biologici quali l'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione dei metalli in traccia da parte degli organismi. Ad oggi molti studi di *bioimaging* sono stati effettuati nel campo delle neuroscienze [120], in particolare nello studio del morbo di Alzheimer, Parkinson e dell'arteriosclerosi [121]. Recentemente, però, le tecniche di *bioimaging* sono state utilizzate anche per lo studio di altri tessuti tra i quali ossa [122], denti [123], occhi [124, 125], fegato [126, 127] e cuore [128]. A integrazione dei dati di *bioimaging*, in alcuni casi viene associato lo studio istologico dei tessuti mediante colorazioni istochimiche [129, 130] e tecniche di immunofluorescenza [121], che possono essere applicate anche a cellule in coltura [131]. Questi lavori sono una conferma di come un approccio multidisciplinare possa dare un contributo significativo anche in aree di ricerca finora considerate esclusive della fisiologia.

2.2 STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

2.2.1 ICP-MS

La spettrometria di massa induttivamente accoppiata al plasma, ICP-MS, è una tecnica per l'analisi degli elementi in traccia che trova impiego in diversi ambiti d'indagine, ad esempio nel settore ambientale, nucleare, geologico, biologico, medico e nello studio dei semiconduttori. In letteratura scientifica sono presenti diversi libri, manuali e *review* che spiegano in dettaglio le componenti strumentali e le possibili applicazioni della tecnica analitica [132, 133].

A differenza di altre tecniche di spettrometria atomica, l'ICP-MS è in grado di effettuare analisi multielementari che presentano intervalli di concentrazione dei diversi analiti molto ampi. Questa tecnica, infatti, è caratterizzata da una linearità molto estesa che va da poche parti per trilione ($\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$) fino a valori di decine di parti per milione ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Attualmente esistono diverse configurazioni disponibili per la strumentazione, ma tutte condividono alcuni componenti fondamentali quali il nebulizzatore, la camera di nebulizzazione o *spray chamber*, la torcia e il detector. Le diverse strumentazioni, invece, possono differire significativamente per il design dell'interfaccia, del sistema di focalizzazione degli ioni, dell'analizzatore di masse e della camera in cui viene creato il vuoto.

Il campione, che generalmente si trova allo stato liquido, viene trasportato da una pompa peristaltica al nebulizzatore. Qui il campione liquido viene convertito in un aerosol fine attraverso l'interazione di un flusso di gas argon (generalmente $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$). Le gocce così formatesi vengono selezionate in base alla loro dimensione nella *spray chamber*: le gocce caratterizzate da un diametro più fine ($5\text{-}6 \mu\text{m}$), che rappresentano solo 1-2% del totale, vengono separate dalle gocce più grandi grazie alla geometria della camera di nebulizzazione. L'aerosol fine che emerge all'uscita della *spray chamber* viene trasportato alla torcia e al plasma attraverso l'iniettore.

Il plasma è il quarto stato fisico che la materia può assumere ed è rappresentato da un gas altamente ionizzato. Normalmente, viene utilizzato un plasma di argon, gas inerte la cui energia di prima ionizzazione (15.75 eV) è più alta dell'energia di prima ionizzazione di quasi tutti gli elementi, e più bassa della loro energia di seconda ionizzazione. In questo modo è possibile ridurre la formazione di ioni a doppia carica. La generazione del plasma in una sorgente ICP è ottenuta a partire da un campo magnetico oscillante che lavora con una frequenza di 27 MHz. Il campo magnetico è generato da una bobina metallica, generalmente di rame, che avvolge la parte finale della torcia. Una corrente elettrica ad alta radiofrequenza viene applicata alla bobina per generare il plasma. Mentre la corrente a radiofrequenza

aumenta progressivamente, l'argon viene fatto fluire all'interno dei tre tubi concentrici della torcia in quarzo solitamente con un flusso di compreso tra i 14 e i 20 L·min⁻¹. L'accensione del plasma inizia con una scintilla ad alto voltaggio che provoca la ionizzazione del gas. Gli elettroni estratti dall'argon vengono accelerati dal campo magnetico, e attraverso collisioni con le molecole neutre di argon, portano alla generazione di altri ioni e altri elettroni. Diverse collisioni tra le specie neutre presenti e gli ioni avvengono nell'arco di un secondo, portando così alla formazione di un plasma stabile, caratterizzato da zone a diversa temperatura. Le diverse zone sono responsabili del processo di degradazione del campione: nel plasma, infatti, il campione viene desolvato, vaporizzato, atomizzato e ionizzato, fino a formare ioni a carica unitaria.

Gli ioni formati vengono estratti attraverso l'orifizio del cono campionatore e raggiungono la zona dell'interfaccia. Questa zona è mantenuta a una pressione di 200 Pa dall'azione di una pompa meccanica rotativa per vuoto. Gli ioni vengono, quindi, trasferiti attraverso il cono separatore alle lenti ioniche, dove il fascio ionico è focalizzato e introdotto dentro la regione ad alto vuoto dell'analizzatore di massa. Questa zona, che è mantenuta in una condizione di alto vuoto (0.133 Pa) dall'azione di una pompa turbomolecolare, ha la funzione di focalizzare elettrostaticamente il fascio di ioni verso l'analizzatore e impedire ai fotoni, alle specie neutre e alle microparticelle di raggiungere il detector. Attualmente la maggior parte degli strumenti con analizzatore di massa a quadrupolo sono venduti con una cella o un'interfaccia di reazione e collisione. Questa tecnologia offre la possibilità di minimizzare le interferenze poliatomiche spettrali attraverso l'introduzione di un gas nella cella, o nell'interfaccia, sfruttando meccanismi di reazione e collisione tra ioni e molecole con lo scopo di ridurre l'effetto delle specie interferenti.

L'ICP-MS è un analizzatore di massa elementare a causa della completa decomposizione di tutte le molecole ad atomi e, quindi, a ioni che avviene nel plasma. Attraverso l'ICP-MS non è possibile ottenere alcuna informazione strutturale o molecolare, ma si possono avere solo informazioni sulla composizione elementare del campione. Come già accennato, esistono diversi analizzatori di massa e sono, inoltre, disponibili diversi tipi di rivelatore. L'analizzatore presente nello strumento utilizzato in questo lavoro di ricerca è un analizzatore di massa a quadrupolo. L'analizzatore di massa a quadrupolo è composto da quattro barre ed è in grado di separare gli ioni in base al loro rapporto massa su carica (m/z). Al quadrupolo viene applicato un campo di radiofrequenza che genera un campo elettrico oscillante. Il rapporto tra i campi elettrici generati è costante, mentre varia il voltaggio. Per ogni voltaggio selezionato, solo gli ioni che presentano un determinato rapporto m/z sono in grado di mantenere una

traiettoria stabile, che consente loro di passare attraverso l'analizzatore. Variando con continuità il campo elettrico, è possibile effettuare una scansione dei diversi rapporti m/z .

Un sistema ICP-MS in generale, è in grado di effettuare analisi multielementari, sebbene gli spettrometri di massa (MS) con analizzatore a quadrupolo siano considerati MS quasi simultanei, in quanto possono analizzare un solo rapporto m/z per singolo voltaggio. In ogni caso, modificando i voltaggi molto velocemente e passando in millisecondi da una massa ad un'altra, diversi elementi possono essere misurati all'interno dello stesso campione. Il numero di elementi che può essere analizzato dipende dal *dwell time*, ovvero dal tempo che lo strumento impiega per acquisire i dati in ogni canale che partecipa alla formazione del picco nello spettro di massa di ogni isotopo, e dalla sensibilità del sistema utilizzato. Nel caso di misure in continuo, la risoluzione diminuisce progressivamente con il numero di isotopi che vengono misurati. La risoluzione di massa di un quadrupolo è considerata bassa, in quanto questo analizzatore è in grado di separare ioni con differenze nel rapporto m/z maggiori di un'unità di massa.

Nel caso in cui si vogliono ottenere informazioni molecolari e studiare la speciazione di un particolare analita, l'ICP-MS può essere accoppiato a diversi sistemi di separazione quali la cromatografia liquida (LC) la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), la cromatografia ionica (IC) e la gascromatografia (GC). Le diverse specie chimiche vengono separate attraverso le tecniche cromatografiche mentre l'ICP-MS viene utilizzato, nella maggior parte dei casi, in linea (*on line*) come analizzatore per rivelare e quantificare le diverse specie. Il principale vantaggio di questa strategia è la possibilità di studiare la speciazione di analiti che si trovano in tracce o ultratracce sfruttando i limiti di rivelabilità che solo l'ICP-MS può garantire. Un sistema di introduzione del campione particolare è il sistema ad ablazione laser (LA): questo dispositivo consente, infatti, di analizzare campioni solidi, evitando il passaggio di mineralizzazione. Questo comporta una riduzione dei tempi necessari alla preparazione dei campioni, riduce il rischio di contaminazione degli stessi e preserva l'informazione spaziale, rendendo così possibile lo studio della distribuzione degli elementi all'interno del campione.

2.2.2 SISTEMI DI INTRODUZIONE DEL CAMPIONE AD ABLAZIONE LASER

Un laser (sistema di amplificazione della luce attraverso l'emissione stimolata di radiazione) consiste sostanzialmente di tre parti fondamentali: una sorgente di energia, un mezzo ottico attivo e un risonatore ottico. La sorgente di energia può essere una luce, quale ad esempio quella emessa da un flash, che viene assorbita ed amplificata dal mezzo ottico attivo. Il risonatore ottico è costruito intorno al mezzo attivo, ed è progettato in modo che la luce passi

più volte attraverso di esso prima di lasciare il risonatore ottico sotto forma di fascio laser. Il laser presente nel sistema utilizzato in questo lavoro è un laser a stato solido, che utilizza un cristallo di ittrio e alluminio (YAG) drogato al neodimio ($\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) come mezzo ottico attivo. Il laser presente nelle due unità di ablazione utilizzate in questo lavoro di ricerca è stato sviluppato specificatamente in modo che, mediante un cristallo ottico non lineare venga generata la quinta armonica della frequenza fondamentale emessa nell'infrarosso (lunghezza d'onda 1064 nm), ottenendo così un fascio laser alla lunghezza d'onda di 213 nm (emissione nella regione dell'ultravioletto).

Durante l'ablazione il fascio laser viene indirizzato e focalizzato sulla superficie del campione, posizionato in una camera di ablazione. La posizione della camera di ablazione nello spazio tridimensionale (xyz) è controllata attraverso il software e mediante l'utilizzo di una fotocamera ad alta risoluzione che acquisisce in tempo reale le immagini relative alla cella di ablazione.

Quando il raggio laser colpisce la superficie del campione, provoca la formazione di particelle e vapori. Le particelle così formate vengono trasportate fuori dalla camera da un flusso di gas, generalmente argon, elio o una miscela dei due. L'uscita della cella di ablazione può essere facilmente connessa alla torcia dell'ICP-MS mediante un tubo in Tygon® dotato di un connettore [134].

Il sistema di introduzione del campione ad ablazione laser utilizzato, in questo lavoro, per lo studio della distribuzione dell'Ag in alcune biopsie cutanee prelevate da pazienti ustionati trattati con argento nanoparticellare, è il sistema LSX-213 G2⁺ (Teledyne CETAC Technologies, Omaha, Nebraska, USA) equipaggiato con una cella HelEx™ a due volumi. La camera di ablazione HelEx™ è composta dalla camera esterna principale e da una cella (*cup*) che crea una nuova camera di ablazione di volume molto ridotto. All'interno delle due aree i flussi di gas percorrono traiettorie a vortice e sono controllati indipendentemente. Il sistema ad alte prestazioni HelEx™ assicura un'efficienza di trasporto ottimale dell'aerosol in ogni punto della camera di ablazione, riduce il frazionamento del materiale ablato e consente l'alloggiamento di campioni anche di grandi dimensioni. Questa geometria limita la perdita del materiale ablato e permette di ridurre i tempi di dilavamento del sistema, incrementando così, la risoluzione spaziale.

Durante il periodo di ricerca all'estero, svolto presso l'Università di Aberdeen, è stato possibile analizzare ulteriori biopsie cutanee utilizzando il sistema di introduzione laser New Wave UP-213 (New Wave, ESI United Kingdom Electro Scientific Industries Europe LTD, Huntingdon, Cambridge, UK) equipaggiato con cella di ablazione standard (diametro interno 60 mm, volume

circa 33 mL), Non è possibile, però, effettuare un confronto tra le prestazioni dei due strumenti in quanto le due unità di ablazione laser sono state utilizzate per studiare la distribuzione dell'Ag in campioni prelevati da pazienti diversi.

2.2.3 UTILIZZO DEL LA-ICP-MS NELLO STUDIO DELLA DISTRIBUZIONE DEGLI ELEMENTI NEI TESSUTI BIOLOGICI

I sistemi di introduzione del campione ad ablazione laser accoppiati all'ICP-MS sono stati introdotti nel 1985. La strumentazione LA-ICP-MS è stata inizialmente utilizzata per analizzare campioni geologici o altri materiali duri, come vetro e metalli. I primi campioni biologici ad essere analizzati, mediante LA-ICP-MS sono stati foglie [135] e denti [136], materiali quindi relativamente duri. L'analisi di campioni biologici molli (tessuti) risale a più di 10 anni fa [105, 137, 138].

Nel caso di analisi di tessuti biologici, generalmente le informazioni spaziali vengono raccolte effettuando scansioni del campione su linee rette, parrallele ed affiancate. A partire dai primi esperimenti ad oggi, il LA-ICP-MS è stato utilizzato per creare un gran numero di mappe di distribuzione degli elementi in campioni biologici [139] compresi cervello [140], fegato [141], occhi [124, 125], muscoli [127, 142], gengiva [143]. Recentemente la strumentazione LA-ICP-MS è stata utilizzata per visualizzare la distribuzione di alcuni marcatori tumorali rilevabili attraverso l'interazione con anticorpi etichettati con determinati elementi. Un esempio è l'utilizzo di anticorpi coniugati a particelle di oro [144] o lantanidi [145, 146] su un campione di tessuto per la diagnosi del tumore alla mammella. In alcuni casi la strumentazione LA-ICP-MS è stata impiegata anche per l'identificazione di metalloproteine dopo che queste erano state separate mediante elettroforesi su gel [147-150].

Come già precedentemente accennato, la tecnica LA-ICP-MS è caratterizzata da una risoluzione nel range dei micron e i limiti di rivelabilità per la maggior parte degli elementi sono nell'ordine di pochi $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$. Si tratta, inoltre, di una tecnica multielementare e multisotopica in grado di misurare, all'interno dello stesso campione, diversi elementi simultaneamente ed effettuare anche analisi di rapporti isotopici [151, 152]. É possibile, quindi, studiare la distribuzione e quantificare diversi traccianti dello stesso elemento, oppure più traccianti provenienti da elementi diversi.

2.2.4 PRINCIPALI LIMITI DELLA TECNICA LA-ICP-MS

Sebbene la tecnica LA-ICP-MS sia ritenuta una tecnica non distruttiva, utile per analisi di grandi oggetti, è da considerarsi distruttiva se applicata alle sezioni sottili. Questo può rappresentare uno svantaggio nel caso in cui siano necessarie informazioni di tipo molecolare. Generalmente, per ovviare al problema, sezioni consecutive vengono analizzate con diverse tecniche e assumendo che non ci siano cambiamenti significativi nella composizione elementare e molecolare tra le diverse sezioni sottili. Va considerato però che una volta affiancate, tali sezioni coprono uno spessore di diversi micron.

Un ulteriore limite è rappresentato dal volume piuttosto ridotto che hanno le celle nella maggior parte dei casi. Le celle di ablazione, infatti, vengono studiate e sviluppate con l'obiettivo di migliorare le dinamiche dei flussi di gas al loro interno e fornire, quindi, un segnale migliore [153]. I volumi ridotti delle celle, però, limitano le dimensioni dei campioni che possono essere alloggiati al loro interno. Per cercare di ovviare a questo problema, sono state sviluppate e messe in commercio celle con geometrie particolari [138, 154, 155].

Infine, a seconda del tipo di cella utilizzata, si può osservare un effetto memoria che può comportare l'introduzione di artefatti e interpretazioni errate delle mappe elementari [142].

Nelle analisi di *bioimaging* lo schema di scansione più comune è quello che prevede l'ablazione di linee parallele da sinistra a destra partendo dall'alto e procedendo verso il basso. In questo modo, al termine dell'analisi, l'area scansionata ha la forma di un rettangolo e questo facilita la successiva elaborazione dei dati. Diverse strategie vengono adottate in merito allo spazio che separa le linee di scansione: alcuni ricercatori preferiscono utilizzare linee affiancate in modo da ottenere il massimo dell'informazione. Altri, al contrario, preferiscono lasciare dello spazio tra una linea e l'altra. Questo spazio non ablato serve a garantire che l'ablazione di una linea non influisca sulla successiva [156, 157]: in alcuni casi, infatti, è stato osservato che, a causa di un trasporto non completo, parte del materiale ablato può ricadere ai lati della linea disegnata dal laser depositandosi sul campione che verrà ablato durante il successivo passaggio del laser. Questa strategia è stata applicata nella maggior parte delle analisi effettuate in questo lavoro di ricerca. Il principale svantaggio di questo approccio è che in questo modo la risoluzione spaziale lungo l'asse y è ridotta. Per alcune mappe qui riportate, si è scelto di utilizzare linee di scansione parzialmente sovrapposte, in modo da poter analizzare il campione con una risoluzione superiore rispetto a quella che può essere selezionata impostando la ruota di apertura, cioè la parte dello strumento che determina le dimensioni del raggio laser. Il tempo richiesto per analizzare l'area di interesse è un fattore importante e limitante nelle analisi di *bioimaging*. Immagini ad alta risoluzione di sezioni sottili di pelle possono richiedere fino a 30

ore di analisi [158]. Per questo è necessario effettuare un'attenta valutazione sia della risoluzione che si vuole ottenere sia del tempo (che si traduce anche in costo) necessario per completare l'analisi. Una valida guida è la nota tecnica pubblicata da Lear e collaboratori [159] in cui viene spiegato come ridurre il tempo di analisi mantenendo una risoluzione ancora accettabile.

Il maggiore problema nelle analisi di *bioimaging* è rappresentato dalla difficoltà di produrre standard di calibrazione per quantificare gli analiti di interesse e dalla mancanza di materiali di riferimento certificati specifici che consentirebbero di validare i risultati ottenuti. In assenza di standard di calibrazione e di idonei materiali di riferimento, i risultati delle analisi quantitative risultano essere poco affidabili, e vanno interpretati ricordando sempre questo grave limite. Diversamente da quanto accade nell'analisi di campioni liquidi, dove lo standard interno può essere aggiunto facilmente in momenti diversi del processo analitico, anche la scelta e l'utilizzo dello standard interno rappresentano una sfida nell'analisi di campioni solidi: l'uso dello standard interno, infatti, è necessario per correggere le variazioni del segnale dovute a fluttuazioni nelle condizioni del plasma, alla variazione della potenza del laser e alla presenza di irregolarità nel campione stesso, in particolare variazioni di spessore. Nell'analisi di alcuni campioni solidi è possibile utilizzare, come standard interno, degli elementi uniformemente distribuiti nella matrice, quali ad esempio il ^{29}Si per l'analisi di campioni di vetro [160], o il ^{44}Ca nell'analisi di denti [161]. Lo stesso approccio è stato applicato in più occasioni nella ricerca di un elemento che potesse essere uno standard interno idoneo nell'analisi di sezioni sottili di tessuti biologici molli. L'elemento che sembrava rispondere meglio alle caratteristiche era il ^{13}C , utilizzato in diversi lavori [162]. Recentemente, però, è stata messa in discussione questa scelta [163]: è stato, infatti, dimostrato che il carbonio ha un comportamento diverso rispetto agli altri analiti (generalmente metalli) sia durante il trasporto sia durante la ionizzazione che avviene nel plasma [163, 164]. Il carbonio, inoltre, non è uniformemente distribuito nei diversi tessuti: questo implica che un campione composto da diversi tessuti, come tessuto connettivo, tessuto adiposo e tessuto muscolare, presenterà variazioni nel contenuto di carbonio non dovute a variazioni nello spessore del campione, ma alla presenza di matrici diverse. Risulta chiaro, quindi, come sebbene l'utilizzo di uno standard interno sia desiderabile, la scelta dell'elemento più idoneo non sia semplice e immediata.

L'introduzione di uno standard interno aggiunto direttamente nel campione si è rivelata essere una strategia efficace: questo è stato realizzato sia attraverso la deposizione di un film polimerico uniforme contenente ittrio e rutenio sul vetrino e appoggiando, successivamente,

la sezione sottile sopra la deposizione [165], sia attraverso la deposizione di uno strato omogeneo di oro metallico sopra il campione da analizzare [124]. Recentemente è stata verificata anche la possibilità di immergere ripetutamente il vetrino con la sezione in una soluzione di metanolo e standard interno, al fine di creare una distribuzione omogenea di standard interno sulla sua superficie [164]. Attraverso l'ablazione completa e simultanea del campione e dello standard interno, è possibile monitorare eventuali variazioni nelle condizioni del plasma o nella sensibilità dello strumento. Questo approccio, però, non è in grado di correggere variazioni del segnale causate da alterazioni nello spessore della sezione sottile.

Sebbene i limiti di rivelazione nelle analisi di *imaging* con il *laser ablation* siano significativamente superiori a quelli ottenibili dall'analisi di campioni liquidi, nella maggior parte dei casi la tecnica LA-ICP-MS si è dimostrata sufficientemente sensibile da poter essere applicata in diversi contesti, tra i quali lo studio della distribuzione dell'Ag in campioni di pelle prelevata da pazienti ustionati trattati con medicazioni contenenti AgNPs.

Come per ogni tipo di analisi, un passaggio cruciale è rappresentato dalla preparazione del campione. Ad oggi sono stati effettuati pochi studi per valutare la ridistribuzione degli elementi nei campioni biologici sottoposti a diversi metodi di conservazione [166], ma è stato dimostrato che l'uso di conservanti liquidi ne altera la distribuzione [167]. La preparazione delle sezioni sottili mediante microtomo rappresenta un passaggio critico in quanto può determinare la contaminazione dei campioni. La principale fonte di contaminazione è la lama del microtomo: essa, infatti, potrebbe non essere adeguatamente pulita, o potrebbe causare uno strascinamento (*smearing*) degli elementi presenti nel campione, come recentemente osservato da Urgast *et al.* [142]. C'è da segnalare, inoltre, che i criomicrotomi di ultima generazione contengono all'interno della camera di taglio nanoparticelle di Ag, per le loro riconosciute proprietà antibatteriche. Se da un lato la presenza dell'Ag riduce il rischio biologico, dall'altro aumenta di molto la probabilità che il campione si contaminerà durante le operazioni di taglio.

Infine, anche il trattamento dei dati rappresenta uno dei fattori limitanti in questo tipo di analisi. Il *bioimaging* richiede che i dati raccolti vengano presentati e visualizzati sotto forma di immagine. Nelle analisi qualitative la scala di rappresentazione dei dati è arbitraria, così come la scelta dell'intervallo di dati da rappresentare con il medesimo colore. I maggiori problemi si manifestano quando le concentrazioni di un elemento si trovano in un intervallo di valori molto ampio e devono essere rappresentate nella medesima figura [142]. Sebbene sia possibile presentare i dati usando diverse vesti grafiche, generalmente gli scienziati scelgono di utilizzare la grafica che più delle altre mette in risalto il significato dei dati. Pertanto sarebbe

opportuno presentare sempre accanto alla figura anche alcuni dei dati numerici che hanno portato alla realizzazione della stessa. Queste considerazioni non sono, ovviamente, da riferirsi alla sola tecnica LA-ICP-MS, ma vanno applicate a tutte le tecniche di *imaging*.

Capitolo 3

3.1 SCOPO DEL LAVORO

A partire dagli anni novanta è stata messa in commercio un'ampia varietà di medicazioni contenenti Ag. Sebbene l'efficacia antimicrobica di queste medicazioni sia stata ampiamente dimostrata *in vitro*, il meccanismo di azione dell'Ag non era stato ancora completamente compreso. Al momento dell'inizio di questo lavoro, mancavano ancora molte informazioni sulla struttura e composizione delle medicazioni contenenti Ag che venivano utilizzate già da tempo nei centri ustione di tutto il mondo. Lo studio della letteratura scientifica ha evidenziato l'assenza di informazioni riguardanti il rilascio di Ag da parte delle medicazioni e la completa mancanza di dati sul destino dell'Ag una volta entrato nel corpo umano in seguito all'applicazione della medicazione sulla ferita.

I primi obiettivi di questo lavoro sono stati, quindi, la caratterizzazione delle medicazioni in uso presso il Centro Ustioni di Padova e la determinazione della quantità e della specie chimica dell'Ag presente all'interno di queste. Un secondo obiettivo del lavoro ha riguardato l'identificazione delle medicazioni più frequentemente utilizzate presso il Centro Ustioni di Padova e la valutazione della quantità di Ag rilasciata dalle stesse durante l'applicazione. Il rilascio di Ag è stato determinato sia attraverso lo studio delle cinetiche di rilascio condotto *in vitro* all'interno di soluzioni di crescente complessità, sia attraverso la quantificazione dell'Ag ancora presente in alcune delle medicazioni utilizzate presso il Centro Ustioni, dopo la loro applicazione su pazienti. Nel corso della ricerca sono stati svolti, inoltre, alcuni esperimenti preliminari finalizzati a verificare la sicurezza dell'argento nanoparticellare, principio attivo presente nella medicazione più utilizzata, nei confronti delle cellule che costituiscono il derma. Il principale obiettivo di questo lavoro era chiarire i meccanismi di azione delle medicazioni, in particolare quelle contenenti argento nanoparticellare. Le nanoparticelle di argento sono, infatti, presenti all'interno di molti prodotti di uso comune, quali capi di abbigliamento sportivo, prodotti per l'igiene personale e per la cura del corpo. Sebbene l'utilizzo di questi materiali nanostrutturati stia crescendo molto rapidamente e il mercato sia in forte espansione, non è ancora stato chiarito come le nanoparticelle d'argento interagiscano con la cute umana. Lo studio dei meccanismi di azione delle medicazioni avrebbe, quindi, permesso di ottenere alcune importanti informazioni sull'interazione tra nanoparticelle e pelle, e di fare

luce sui meccanismi di assorbimento, trasporto e distribuzione degli elementi nanostrutturati all'interno dell'organismo umano.

L'indagine sui meccanismi di azione delle medicazioni impiegate nella cura delle ustioni è stata condotta attraverso la valutazione delle specie chimiche dell'Ag che vengono rilasciate dai prodotti contenenti nanoparticelle di argento dopo il contatto con la ferita. Parallelamente è stato verificato come l'Ag si distribuisce tra i vari tessuti che compongono la pelle. A tale scopo sono state effettuate analisi di microscopia elettronica a trasmissione su biopsie cutanee prelevate da pazienti trattati con argento nanoparticellare. Lo scopo delle analisi era valutare la presenza e la localizzazione subcellulare delle nanoparticelle eventualmente rilasciate dalla medicazione. Lo studio della distribuzione dell'Ag nella pelle è stato, invece, condotto sia attraverso la determinazione del profilo di concentrazione dell'Ag nelle biopsie, sia attraverso l'ottenimento di mappe (qualitative) di distribuzione dell'Ag in sezioni sottili di biopsie cutanee mediante analisi LA-ICP-MS.

Capitolo 4

La caratterizzazione delle medicazioni contenenti Ag e usate per il trattamento delle ustioni è stata effettuata sui prodotti presenti e utilizzati presso il Centro Ustioni dell'Ospedale Universitario di Padova. Le medicazioni oggetto di studio sono sei e sono commercializzate in Italia con il nome Acticoat™ Flex3 (Smith&Nephew, Milan, Italy), Actisorb® Silver220 (Johnson & Johnson, Rome, Italy), Aquacel® Ag (ConvaTec, Rome, Italy), Urgosorb® Ag (Fidia, Abano Terme, Italy), Mepilex® Ag (Mölnlycke Health Care, Gallarate, Italy), e Cellosorb® Ag (Fidia, Abano Terme, Italy). In tabella 1 sono riportate le informazioni presenti in letteratura e relative alla composizione chimica della struttura polimerica di ogni medicazione. E' riportata, inoltre, la specie chimica dell'Ag presente nella medicazione secondo quanto dichiarato dal produttore e nei dati di letteratura.

Medicazione	Polimero	Specie argento
Acticoat™ Flex3	Poliestere	Nanoparticelle
Actisorb® Silver220	Nylon e carbon attivi	Argento metallico
Aquacel® Ag	Sodio Carbossimetilcellulosa	Argento ionico
Urgosorb® Ag	Alginato di calcio e sodio carbossimetilcellulosa	Sale di $\text{Ag}^+\text{Na}^+\text{Zr}_2(\text{PO}_4)_3^-$
Mepilex® Ag	Schiuma in poliuretano con strato di silicone	Sali di argento
Cellosorb® Ag	Rete di poliestere impregnata con idrocolloidi e vasellina, sostegno in schiuma poliuretana	Argento solfato

Tabella 1: Principali caratteristiche delle medicazioni: specie chimica dell'Ag, composizione e struttura del polimero secondo quanto dichiarato dal produttore o riportato in letteratura

4.1 CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DELLE MEDICAZIONI MEDIANTE ANALISI SEM-EDS

4.1.1 PARTE SPERIMENTALE

Una prima caratterizzazione è stata effettuata presso l'Istituto di Chimica Inorganica e delle Superfici del Consiglio Nazionale delle Ricerche (ICIS-CNR) utilizzando un microscopio elettronico a scansione (SEM) Philips XL-40 dotato di sistema per microanalisi chimica a raggi X con rivelatore a dispersione di energia (EDS, EDAX Inc., Mahwah, NJ). Tutte le medicazioni sono state analizzate direttamente senza metallizzazione. Le immagini degli elettroni

retrodiffusi sono state acquisite a 25kV e con un ingrandimento di 2500 volte. Con lo scopo di ottenere delle informazioni sulla composizione qualitativa della superficie, sono stati acquisiti spettri EDS delle zone più interessanti visivamente.

4.1.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

Le immagini acquisite e i relativi spettri EDS sono presentati in figura 1.

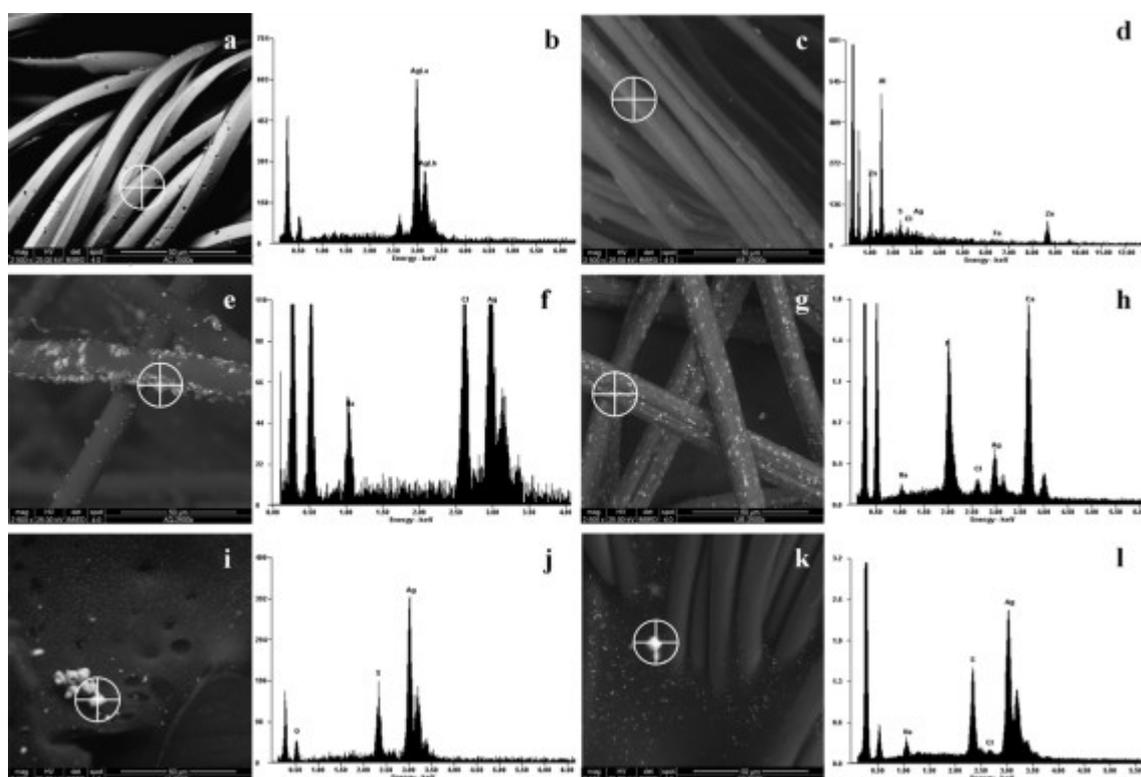


Figura 1: immagini SEM delle medicazioni e corrispondenti spettri EDS. Acticoat™ Flex3 (a) e (b); Actisorb® Silver220 (c) e (d); Aquacel® Ag (e) e (f); Urgosorb® Ag (g) e (h); Mepilex® Ag (i) e (j); Cellosorb® Ag (k) e (l). Tratto da Roman et al., Talanta 2013.

L' Acticoat™ Flex3 è composto da un tessuto di poliestere, altamente flessibile, ricoperto da argento nanocristallino. Le fibre di poliestere dell'Acticoat™ Flex3 (a) hanno una sezione regolare e poligonale di circa 10 μm di diametro, e sono uniformemente ricoperte da aggregati di particelle. Il diametro del singolo aggregato è di circa 100 nm. Lo spettro EDS (b) conferma che gli aggregati sono composti di solo argento metallico. L'Actisorb® Silver220 è una medicazione composta da due parti: un involucro esterno fatto di un "tessuto non tessuto" di nylon che

racchiude una rete di viscosa di rayon cosparsa di carboni attivi e impregnata di Ag [168]. Le fibre dell' Actisorb® Silver220 (c) sono morfologicamente simili a quelle dell'Acticoat™ Flex3 ma attraverso l'analisi SEM (d) non è stato possibile identificare la presenza dell'Ag. Secondo il foglietto illustrativo, l'Actisorb® Silver220 è la medicazione che contiene la più bassa concentrazione di Ag tra tutti i prodotti oggetto di studio. Altri metalli quali Zn e Al sono presenti nelle fibre, probabilmente come impurità assorbite dai carboni attivi durante la realizzazione del prodotto.

L' Aquacel® Ag è composto da fibre di carbossimetilcellulosa [169, 170]. Le analisi effettuate al SEM - EDS evidenziano come le fibre di carbossimetilcellulosa (e) abbiano un diametro più variabile e una tessitura meno regolare. L'Ag sembra essere presente solo in corrispondenza dei cristalli bianchi che si trovano depositati sulla superficie e lo spettro EDS (f) indica che sono composti da AgCl e NaCl. Le fibre dell' Urgosorb® Ag (g) hanno un aspetto simile a quello delle fibre dell'Aquacel® Ag. Cristalli di CaCO₃ opachi e dalla forma cubica sono depositati sulla superficie. L'Ag è presente in altri piccoli cristalli, che si trovano sia depositati sulla superficie sia inclusi all'interno della matrice. Lo spettro EDS (h) indica che la composizione elementare dei cristalli comprende C, O, Ca, P/Zr, Ag, Na e Cl in proporzioni variabili e corrispondenti a due forme differenti dei cristalli: sono stati osservati, infatti, cristalli cubici brillanti e agglomerati allungati dalla forma irregolare. Questi ultimi hanno la più alta concentrazione di Ag. Il Mepilex® Ag è un cuscinetto in schiuma poliuretanic, spesso circa 5 mm e contenente sali d'argento. Un lato della medicazione è rivestito da uno strato in silicone che va posto a contatto con la ferita e il cui scopo è consentire l'adesione della medicazione alla pelle sana [171-173]. Le immagini SEM del Mepilex® Ag (i) mostrano la struttura porosa di questa medicazione ed evidenziano la presenza di grandi cristalli depositati sulla superficie della schiuma. Lo spettro EDS (j) indica che i cristalli sono composti da Ag₂SO₄. Utilizzando un ingrandimento superiore è possibile osservare la presenza di cristalli più piccoli di Ag₂SO₄ che si trovano incastrati all'interno della matrice ma che probabilmente contribuiscono marginalmente a determinare il contenuto totale di Ag. Il Cellosorb® Ag (k) ha una struttura molto complessa, e come atteso l'Ag si trova solo nella rete di poliestere. Le immagini al SEM indicano che le fibre in poliestere non sono uniformemente impregnate nella matrice di vasellina e idrocolloidi. L'Ag è presente solo nella matrice e come per il Mepilex® Ag la specie principale è l'argento solfato (l) che si presenta sottoforma di grossi cristalli depositati sulla superficie e piccoli cristalli incastrati dentro la matrice. Sodio e cloro sono presenti, anche se in minore percentuale.

4.2 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE TOTALE DI ARGENTO NELLE MEDICAZIONI

La mancanza di materiali certificati per la determinazione della concentrazione di Ag nelle matrici polimeriche oggetto di questo studio, e l'elevata concentrazione di Ag in questi prodotti rendono la validazione dei risultati una sfida impegnativa. La robustezza dello studio è stata migliorata utilizzando un approccio di validazione interna incrociata. Due diverse strategie di mineralizzazione sono state sviluppate per ogni medicazione e sono state confrontate per accuratezza e precisione. La prima strategia prevedeva la messa a punto di metodi di mineralizzazione acida e dissoluzione all'interno di crogioli su piastra calda (sistema aperto). L'altra strategia prevedeva la messa a punto di una digestione acida e l'utilizzo di un mineralizzatore a microonde (sistema chiuso). Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato mediante analisi di ICP-MS, e quantificati sia con calibrazione esterna sia mediante analisi di diluizione isotopica. L'analisi di diluizione isotopica è, infatti, considerata un metodo di riferimento assoluto ed è stata già usata in passato in alcuni casi per analisi di campioni metallurgici [174, 175].

Considerata la complessità dei campioni da analizzare e avendo osservato che in alcuni casi le particelle contenenti argento si trovavano incluse all'interno della matrice, la completa mineralizzazione della materia organica è apparsa come un requisito fondamentale per la totale solubilizzazione dell'Ag. La mineralizzazione dei polimeri è un processo difficile e spesso deve essere ottimizzato per ogni materiale [87]. Il metodo di mineralizzazione acida a caldo in un forno a microonde da laboratorio all'interno di contenitori in teflon è sicuramente la strategia preferibile in termini di riproducibilità, riduzione delle contaminazioni e sicurezza per l'operatore. Purtroppo, però, questo metodo alle volte è insufficiente per ottenere una mineralizzazione completa. Per ottenere una completa digestione dei campioni in alcuni casi è necessario un pretrattamento ad alta energia [87]. Al fine di evitare la necessità di questo passaggio, sono state fatte diverse prove con solventi organici, compresi diclorometano, toluene, tetraidrofurano, dimetilsolfossido, acetone, etere e cloroformio, per ottenere una dissoluzione completa o parziale della componente polimerica. Le prove sono state condotte mettendo all'interno di un crogiolo di ceramica un frammento di ogni medicazione e aggiungendo 10 mL di solvente organico. Il crogiolo è stato poi posizionato su una piastra riscaldante fino al raggiungimento della temperatura di ebollizione del solvente. Per dissolvere la carbossimetilcellulosa è stata utilizzata una soluzione di NaOH 0.2 M.

Nel caso in cui il trattamento con solventi organici fosse insufficiente per ottenere la completa dissoluzione del campione, si è proceduto con un attacco acido. Un frammento di 10 mg di ogni medicazione è stato posto all'interno di un crogiolo in ceramica. Il campione è stato coperto con 4 mL di HNO₃. Il crogiolo è stato poi posizionato su una piastra riscaldante a 200°C. Aliquote di 2 mL di HNO₃ sono state progressivamente aggiunte per favorire la mineralizzazione del campione. Nel caso in cui anche questa strategia non fosse sufficiente per ottenere una completa digestione del frammento, è stato necessario utilizzare un pretrattamento a elevate temperature in muffola. I campioni talquali sono stati inseriti all'interno di crogioli chiusi con coperchi in ceramica e calcinati in muffola. Una volta raffreddati, i residui solidi dei campioni sono stati mineralizzati su piastra calda con HNO₃ come descritto precedentemente.

La digestione in forno a microonde è stata condotta all'interno di contenitori in teflon su aliquote di campione il cui peso era compreso tra 25 e 50 mg. A seconda del tipo di campione analizzato, è stato utilizzato HNO₃ o una miscela di HNO₃ e H₂O₂. In alcuni casi è stato necessario utilizzare un programma di mineralizzazione in due fasi. L'efficacia della mineralizzazione è stata valutata attraverso ispezione visiva e verificando l'assenza di precipitati dopo che il campione è stato centrifugato per alcuni minuti.

4.2.1 PARTE SPERIMENTALE

4.2.1.1 Preparazione Dei Campioni, Stima Dei Recuperi E Scelta Della Matrice In Cui Diluire I Campioni Per L'Analisi

Ogni medicazioni è stata tagliata a mano con una forbice in piccoli frammenti di circa 1 mm². I frammenti sono stati mescolati insieme per formare un campione unico di riferimento e il più possibile omogeneo (*pool*). Considerata la natura delle matrici polimeriche, non sono stati identificati altri metodi per ridurre le medicazioni in polveri più fini e migliorare l'omogeneità del campione prima dell'analisi. Da ogni campione di riferimento sono state prelevate tre aliquote da 50 mg ciascuna che sono state mineralizzate nel sistema aperto, e tre aliquote che sono state digerite nel forno a microonde. Per ogni metodo sono state prelevate ulteriori tre replicati che sono stati addizionati (*spiked*) con una soluzione di AgNO₃ 10 mg·g⁻¹ per stimare i recuperi. E' stato scelto di utilizzare l'AgNO₃ poichè nelle medicazioni oggetto di studio sono presenti diverse specie di Ag e nella maggior parte dei casi si tratta di sali d'argento.

La soluzione di AgNO_3 è stata aggiunta ai campioni immediatamente dopo che questi sono stati pesati, e lasciata evaporare prima di procedere alla mineralizzazione. La quantità di AgNO_3 aggiunta ad ogni aliquota ha incrementato la concentrazione di Ag attesa rispettivamente del 25%, 50% e 100%.

Sono state condotte delle prove per valutare quale fosse la matrice migliore in cui diluire i campioni per l'analisi ICP-MS. L'attenzione è stata posta in particolare nell'identificare una matrice che riducesse il più possibile l'effetto memoria dell'Ag. Le soluzioni oggetto di studio sono state uno standard di AgNO_3 $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ preparato in HNO_3 2% m/m e uno standard di AgNO_3 $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ preparato in NH_4OH 2.8% m/m. Lo studio è stato condotto acquisendo il segnale dell'Ag in funzione del tempo per entrambe le soluzioni. Il metodo utilizzato prevedeva una fase di prelievo del campione della durata di un minuto, una fase di stabilizzazione del segnale e una fase di acquisizione entrambe della durata di un minuto al fine di simulare il più possibile il metodo e le condizioni sperimentali che sarebbero state adottate nel corso della successive analisi di ICP-MS per la quantificazione dell'Ag presente nei campioni disaggregati. È stato confrontato l'andamento del segnale dell'Ag durante la fase di lavaggio, al fine di verificare in quale delle due matrici la diminuzione dell'intensità fosse più rapida e con una minore presenza di picchi (*spikes*).

Le diluizioni intermedie dei campioni sono state fatte in una soluzione di HNO_3 al 2% v/v, mentre la diluizione finale è stata fatta immediatamente prima dell'analisi in una soluzione di NH_4OH 10% m/m. La concentrazione totale di Ag è stata quantificata mediante analisi diretta in ICP-MS usando le condizioni operative riportate in tabella 2.

Potenza generatore di radiofrequenza	1500W
Flusso del plasma gas	15 L min^{-1}
Flusso del gas di trasporto	1.2 L min
Impostazioni lenti ioniche	Ottimizzate giornalmente per ottenere il massimo della sensibilità usando una soluzione $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ di Li, Co, Y, Tl in una soluzione di HNO_3 2% v/v
Cella di reazione e collisione	No gas/ He $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Punti per picco	3
Tempo di acquisizione per massa	1s
Replicati	5

Tabella 2: condizioni operative della strumentazione ICP-MS durante la analisi quantitative con calibrazione esterna (ICP-QMS) e analisi di diluizione isotopica (ICP-CRC-QMS).

4.2.1.2 Strategie Di Quantificazione Dell'Argento

Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato mediante analisi ICP-MS utilizzando sia la strategia di quantificazione mediante calibrazione esterna sia mediante analisi di diluizione isotopica. In entrambi i casi i campioni sono stati diluiti fino a ottenere una concentrazione di $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ sulla base della concentrazione attesa. Questa concentrazione, infatti, è sufficientemente alta per ottenere misure precise e, allo stesso tempo, garantisce che tutti i campioni vengano analizzati in modalità *pulse counting* e con ridotti effetti memoria. Le analisi con calibrazione esterna sono state condotte utilizzando uno strumento ICP-QMS 7500 is, che non è dotato di cella di collisione. L'uso della cella di collisione non è necessario nella quantificazione dell'Ag in questa serie di analisi in quanto gli elementi interferenti (Mo e Nb) non erano presenti nel campione o si trovavano a concentrazioni trascurabili (Zr) nel solo Urgosorb® Ag. Per la calibrazione esterna è stata utilizzata una curva a sette punti e ogni 6 campioni è stato analizzato uno standard di controllo la cui concentrazione era pari a $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. Le analisi di diluizione isotopica sono state condotte utilizzando uno strumento ICP-QMS 7500cx con elio come gas di collisione. In questo caso, la cella di reazione è stata utilizzata solo come camera di miscelazione, impostando una differenza di voltaggio nulla tra l'ingresso e l'uscita. In questo modo è stato possibile aumentare l'intensità del segnale e migliorare la stabilità del rapporto tra i due isotopi attraverso la riduzione della dispersione cinetica del fascio di ioni [176]. L'isotopo scelto per essere aggiunto come *spike* è stato il ^{109}Ag mentre ^{107}Ag è stato scelto come isotopo di riferimento.

La concentrazione dell'analita nel campione (C_s) è stata determinata utilizzando la seguente formula:

$$c_s = c_{sp} \frac{m_{sp}}{m_s} \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m \cdot R_s} \right)$$

Dove R_s è il rapporto isotopico nel campione ($^{109}\text{Ag}/^{107}\text{Ag}$) e R_{sp} è il rapporto isotopico nello *spike* ($^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$); R_m è il rapporto isotopico misurato nel campione dopo l'aggiunta dello *spike* ($^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$); A_s^a è l'abbondanza relativa dell'isotopo Ag^{107} nel campione e A_{sp}^b è l'abbondanza dell'isotopo Ag^{109} nello *spike*; M_s e M_{sp} peso atomico dell'Ag nel campione e nello *spike*, rispettivamente; m_s e m_{sp} la massa del campione e della soluzione di *spike*, rispettivamente; e c_{sp} concentrazione dell'elemento nello *spike*.

Il tempo morto del rivelatore nello strumento utilizzato in queste analisi è stato stimato attraverso il metodo proposto da Vanhaecke [177], adattato alle soluzioni di Ag. Il valore

misurato è stato pari a 34.0 ± 0.6 ns. Le intensità del segnale sono state automaticamente corrette per questo valore dal software dello strumento e la correzione è stata applicata a tutte le successive analisi di diluizione isotopica. Il fattore di correzione del bias di massa (*mass bias*) è stato calcolato come la differenza tra il rapporto isotopico teorico e il rapporto isotopico misurato sperimentalmente in uno standard naturale di Ag $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. La correzione è stata, quindi, applicata a tutti i risultati dei successivi campioni e aggiornata ogni sei analisi sulla base dell'intensità dello standard di riferimento. E' stato assunto in questo lavoro che le abbondanze isotopiche nei campioni reali fossero quelle naturali e indicate da Rossman e Taylor [178], quindi, 51.839 ± 0.059 per ^{107}Ag e 48.161 ± 0.055 per ^{109}Ag . Le deviazioni standard qui riportate sono state calcolate da noi attraverso l'analisi di uno standard naturale di Ag $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

Le abbondanze isotopiche nella soluzione di spike sono state calcolate attraverso l'analisi di una diluizione a $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ della soluzione madre di *spike*. I valori misurati sono stati 0.434 ± 0.001 per ^{107}Ag e 99.564 ± 0.038 per ^{109}Ag .

Una soluzione madre di ^{109}Ag alla concentrazione di $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ circa è stata preparata per essere addizionata ai diversi campioni. La concentrazione esatta è stata determinata accuratamente, dopo opportuna diluizione, utilizzando l'analisi di diluizione isotopica inversa e utilizzando uno standard certificato con abbondanza isotopica relativa naturale. La teoria di propagazione dell'errore [179] è stata applicata per minimizzare il fattore di propagazione dell'errore e, quindi, ottimizzare il rapporto tra lo *spike* e il campione. Per tutti i campioni la concentrazione di Ag è stata determinata mediante calibrazione esterna prima di effettuare le analisi di diluizione isotopica. In questo modo è stato possibile stimare per ogni campione il rapporto ottimale tra il campione e lo *spike* sulla base del risultato ottenuto attraverso la quantificazione con calibrazione esterna. Il coefficiente di correlazione intraclasse (ICC) è stato calcolato per confrontare la calibrazione esterna e l'analisi di diluizione isotopica in termini di contributo relativo di ripetibilità analitica alla ripetibilità globale del metodo. L'ICC è stato calcolato come $\sigma_B^2 / (\sigma_W^2 + \sigma_B^2)$. La varianza tra campioni è calcolata come $\sigma_B^2 = n\sigma_\mu^2$ con $n=3$ ovvero il numero dei replicati, mentre σ_μ^2 è la varianza della loro media. La varianza all'interno del campione è calcolata, invece, come $\sigma_W^2 = (n-1)/(k-1)\sum_i \sigma_i^2$ dove $k=5$ ovvero il numero di replicati di acquisizione e σ_i^2 è la varianza del campione individuale. Il valore di ICC varia tra 0 e 1: più il coefficiente si avvicina a 1, tanto più alta è la proporzione di varianza tra i replicati sulla varianza totale.

4.2.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.2.2.1 Messa A Punto Dei Metodi Di Mineralizzazione

Tra tutti i solventi testati, il dimetilsolfossido è stato l'unico che si è dimostrato in grado di sciogliere la componente poliuretanica del Mepilex® Ag. Diversamente questo solvente non ha avuto alcun effetto sullo strato di silicone o sulla componente poliuretanica del Cellosorb® Ag. La soluzione di NaOH è stata in grado di sciogliere la matrice dell'Aquacel® Ag già a temperatura ambiente e sotto agitazione con vortex, ma non ha prodotto alcuna alterazione della medicazione Urgosorb® Ag. La digestione acida senza pretrattamento su piastra riscaldante si è dimostrata efficace solo per Urgosorb® Ag e Cellosorb® Ag. Per le altre medicazioni, il pretrattamento ad elevate temperature in muffola si è rivelato importante per ottenere una completa mineralizzazione acida del residuo solido.

I metodi di mineralizzazione sviluppati in sistema aperto sono riportati in tabella 3.

	Pretrattamento	Mineralizzazione	Dissoluzione
Acticoat™ Flex3	60 min 200°C, 60 min 400°C, 90 min 650°C	4mL HNO ₃ 200°C	
Actisorb® Silver220	60 min 200°C, 60 min 400°C, 90 min 650°C	4mL HNO ₃ 200°C	
Aquacel® Ag		5mL NaOH 0.2 M T ambiente	
Urgosorb® Ag		4mL HNO ₃ + 2mL H ₂ O ₂	Centrifugare 10 min a 3000 rpm e ridissolvere il precipitato in NH ₄ OH concentrato
Mepilex® Ag	DMSO caldo	4mL HNO ₃ + 2mL H ₂ O ₂	
Cellosorb® Ag		4mL HNO ₃ + 2mL H ₂ O ₂	Centrifugare 10 min a 3000 rpm e ridissolvere il precipitato in NH ₄ OH concentrato

Tabella 3: ottimizzazione di metodi di mineralizzazione in sistema aperto. Tutti i metodi sono stati sviluppati utilizzando 50 mg di campione.

Acticoat™ Flex3 e Actisorb® Silver220 (circa 50mg ciascuno) sono stati calcinati utilizzando il seguente programma: 1 ora a 200° C, seguita da 1 ora a 400° C e quindi 1 ora e 30 minuti a 650° C. Il residuo solido è stato recuperato con 4 mL di HNO₃ e scaldato a 200° C su piastra

riscaldante per alcuni minuti fino a completa dissoluzione. L'Aquacel® Ag (circa 50 mg) è stato posto all'interno di una provetta in polipropilene ed è stato disciolto in 5 mL di NaOH 0.2 M mescolando la soluzione a elevata velocità con un agitatore vortex. Le medicazioni Urgosorb® Ag e Cellosorb® Ag sono state pesate nei crogioli di ceramica e digerite direttamente a 200° C su piastra riscaldante con 4 mL di HNO₃. Per ottenere una completa mineralizzazione del Cellosorb® Ag è stato necessario aggiungere anche 2 mL di H₂O₂. Il Mepilex® Ag (circa 25 mg) è stato parzialmente sciolto dal trattamento con dimetilsolfossido caldo. La restante parte in silicone è stata, quindi, disgregata in seguito all'aggiunta di 4 mL di HNO₃ e 2 mL di H₂O₂ all'interno del crogiolo scaldato a 200° C. Come osservato durante la caratterizzazione strutturale mediante analisi SEM-EDS, all'interno delle medicazioni Aquacel® Ag, Urgosorb® Ag e Cellosorb® Ag è presente cloro. Questo porta alla precipitazione di AgCl durante la mineralizzazione acida dei prodotti: AgCl, infatti, non è solubile in HNO₃. Diversamente la precipitazione di AgCl non avviene durante la mineralizzazione alcalina dell'Aquacel® Ag. Il precipitato è stato separato dal surnatante mediante centrifugazione (10 minuti a 3000 rpm). Una volta rimosso il surnatante, il precipitato è stato ridisciolti in NH₄OH concentrato. L'analisi del surnatante e del precipitato ridisciolti ha evidenziato che circa il 40% e il 10% dell'Ag presente rispettivamente in Urgosorb® Ag e in Cellosorb® Ag si trovavano nel precipitato. Per questo motivo, la ridissoluzione e l'analisi del precipitato sono state incluse in tutti gli esperimenti successivi e i risultati qui presentati rappresentano la somma dell'Ag presente nelle due frazioni.

I metodi di mineralizzazione in forno a microonde sviluppati in questo lavoro sono riassunti in Tabella 4 e sono stati applicati a 25 mg di campione. Per ottenere una completa disgregazione delle medicazioni Acticoat™ Flex3 e Actisorb® Silver220, le stesse che avevano richiesto un pretrattamento a elevate temperature con il sistema di mineralizzazione aperto, è stato necessario mettere a punto un programma di mineralizzazione particolarmente aggressivo. È stato possibile disgregare completamente l' Acticoat™ Flex3 attraverso un programma in due fasi. La prima fase consisteva in una digestione a 200° C con 10 mL di HNO₃. Successivamente il contenitore in teflon è stato raffreddato a temperatura ambiente e aperto per consentire l'aggiunta di 2 mL di H₂O₂. La digestione è stata, quindi, ripetuta a 200° C per 10 minuti. L'Actisorb® Silver220, che è composto da fibre di carboni attivi, è stato mineralizzato completamente lasciando reagire il campione per due ore a pressione atmosferica e a temperatura ambiente all'interno del contenitore in teflon. La mineralizzazione è poi proseguita con l'aggiunta di 8 mL di HNO₃ e il trasferimento del contenitore in forno a microonde per 50 minuti a 200°C. La mineralizzazione in microonde delle altre medicazioni è

stata ottenuta usando programmi più corti. Il metodo sviluppato per l'Aquacel® Ag si è dimostrato molto più complesso e costoso rispetto a quello messo a punto nel sistema aperto, che prevedeva una dissoluzione a temperatura ambiente in una soluzione di NaOH 0.2 M. Con il metodo di mineralizzazione in sistema chiuso, si è osservata la formazione di una considerevole quantità di precipitato contenente circa il 95% di tutto l'Ag presente nel campione. E' stato, quindi, necessario procedere con la centrifugazione del digerito e la successiva ridissoluzione del precipitato. Come già descritto precedentemente per i metodi messi a punto nel sistema di mineralizzazione aperto, al termine della digestione in forno a microonde delle medicazioni Urgosorb® Ag e Cellosorb® Ag, è stato necessario centrifugare e ridisciogliere il precipitato di AgCl formatosi e che per questi due campioni rappresentava rispettivamente il 98% e 10% di tutto l'Ag presente.

	Reagente	Programma	Potenza
Acticoat™ Flex3	Fase 1: 8mL HNO ₃ Fase 2: + 2mL H ₂ O ₂	10 min 200°C, 50 min 200°C 10 min 200°C, 10 min 200°C	fino a 1500 W
Actisorb® Silver220	Fase 1: 2mL H ₂ O ₂ Fase 2: + 8mL HNO ₃	Lasciar reagire per due ore 10 min 200°C, 50 min 200°C	fino a 1500 W
Aquacel® Ag	8mL HNO ₃ + 2mL H ₂ O ₂	10 min 160°C, 5 min 180°, 15min 200°C	fino a 1500 W
Urgosorb® Ag	8mL HNO ₃ + 2mL H ₂ O ₂	10 min 180°C, 5 min 200°, 15min 200°C	fino a 1500 W
Mepilex® Ag	9mL HNO ₃ + 1mL H ₂ O ₂	10 min 160°C, 5 min 180°, 5min 200°C	fino a 1500 W
Cellosorb® Ag	9mL HNO ₃ + 1mL H ₂ O ₂	10 min 160°C, 5 min 180°, 15min 200°C	fino a 1500 W

Tabella 4: ottimizzazione di metodi di mineralizzazione acida in forno a microonde. Tutti i metodi sono stati sviluppati utilizzando 25 mg di campione.

4.2.2.2 Stima Dei Recuperi

Di tutte le medicazioni mineralizzate con il sistema di aperto, solo Mepilex® Ag e Aquacel® Ag hanno presentato un recupero quantitativo (entrambi $96 \pm 4\%$). Diversamente i recuperi delle altre medicazioni sono stati inferiori: la mineralizzazione dell'Acticoat™ Flex3 ha dato un recupero del $79 \pm 7\%$ mentre quella dell'Actisorb® Silver220 è stata del $77 \pm 3\%$. Considerato, però, che le concentrazioni di Ag totale determinate con il metodo del sistema aperto sono in accordo con quelle ottenute con il sistema chiuso, è ragionevole ritenere che i recuperi siano stati sottostimati a causa della perdita di Ag dalla soluzione di *spike* durante la calcinazione. La

specie di Ag utilizzata per lo *spike*, infatti, era AgNO_3 e questo sale ha punto di ebollizione a 444°C , inferiore a quello dell'argento metallico (2212°C) e soprattutto alla temperatura massima raggiunta durante la calcinazione. Inoltre, la calcinazione è stata condotta in contenitori non ermeticamente sigillati. Bassi recuperi sono stati ottenuti per l' Urgosorb® Ag ($52 \pm 7\%$) e il Cellosorb® Ag ($77 \pm 18\%$). Nel caso del Cellosorb® Ag la bassa precisione riscontrata indica che il processo di mineralizzazione in sistema aperto è poco riproducibile. Al contrario sono stati ottenuti recuperi quantitativi per tutti i metodi di mineralizzazione in sistema chiuso messi a punto per le medicazioni. Sono stati ottenuti recuperi pari al $111 \pm 6\%$ per l'Acticoat™ Flex3, $110 \pm 4\%$ per l'Actisorb® Silver220, $102 \pm 1\%$ per l' Aquacel® Ag, $106 \pm 2\%$ per Urgosorb® Ag, $103 \pm 1\%$ per il Mepilex® Ag ed infine pari al $104 \pm 4\%$ per il Cellosorb® Ag. Se confrontato con il sistema aperto, il sistema di mineralizzazione in forno a microonde ha il vantaggio di garantire un ambiente sigillato e condizioni più riproducibili. Va comunque sottolineato la mineralizzazione in forno a microonde non rappresenta sempre la scelta migliore poichè per specifiche applicazioni, come nel caso della dissoluzione dell' Aquacel® Ag in una soluzione di NaOH 0.2 M, metodi più semplici e più economici possono risultare più veloci e altrettanto efficaci.

4.2.2.3 Scelta Della Matrice In Cui Diluire I Campioni Per L'analisi

Nella quantificazione dei metalli mediante ICP-MS i campioni vengono generalmente diluiti con soluzioni a bassa concentrazione di HNO_3 (tipicamente 1 – 2% m/m HNO_3) al fine di mantenere il pH acido necessario per stabilizzare gli elementi in soluzione. Le prove effettuate utilizzando questo tipo di diluente hanno però evidenziato un significativo effetto memoria, che probabilmente può essere imputato all'accumulo di Ag^+ sulla superficie degli elementi in quarzo della strumentazione, in particolare la camera di nebulizzazione [180]. Questo fenomeno si traduce in un aumento del segnale di fondo e nella comparsa di picchi di segnale la cui frequenza e intensità aumentano durante le analisi lunghe (oltre 8 ore di analisi continuative). Ne consegue, quindi, la necessità di interrompere le analisi e procedere con la pulizia completa della strumentazione. Per ovviare al problema, in questo lavoro abbiamo cercato una soluzione alternativa che fosse adatta all'analisi dell' Ag^+ . Tra le varie soluzioni testate è stata provata una soluzione di NH_4OH 2.8% m/m a pH 12. L'ammoniaca, infatti, è una base soft di Lewis che stabilizza l' Ag^+ (il quale a sua volta è un acido soft di Lewis) in soluzione formando come specie principale il complesso diamminico $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ [181]. Il complessamento con l'ammoniaca solubilizza la maggior parte degli alogenuri di argento (eccetto AgI) che possono essersi depositati sulle superfici delle parti in quarzo, incrementa la pulizia dello

strumento durante le fasi di lavaggio e previene l'interazione tra Ag^+ e le componenti strumentali [180].

Nella figura 2 è riportato il risultato di un confronto tra l'analisi di uno standard $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ preparato in HNO_3 2% m/m e in NH_4OH 2.8% m/m. I dati sono stati normalizzati per la concentrazione reale dello standard. E' possibile osservare come durante la fase di lavaggio successiva all'analisi, l'intensità del segnale dell'Ag diminuisca più velocemente e senza picchi quando viene utilizzata la soluzione di NH_4OH 2.8% m/m. Per verificare la stabilità dei campioni diluiti in ammoniaca, le provette contenenti gli standard (da 1 a $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) sono state lasciate aperte nell'autocampionatore e analizzate periodicamente nell'arco di 24 ore.

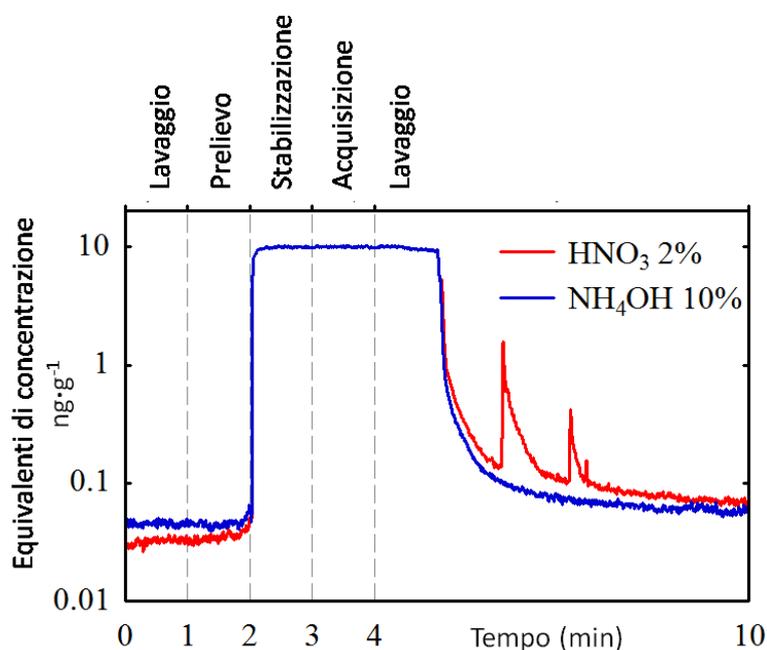


Figura 2: Valutazione dell'effetto memoria dell'Ag. Gli standard $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ sono stati preparati in HNO_3 2% m/m e in NH_4OH 2.8% m/m.

Per quantificare gli standard di controllo è stata utilizzata la calibrazione esterna e sono state impegnate di volta in volta curve di calibrazione preparate al momento. I risultati hanno evidenziato l'assenza di differenze significative nella concentrazione degli standard lasciati aperti per 24 ore. Alla luce degli esperimenti condotti, per garantire una maggiore stabilità del campione è stato scelto di preparare i campioni da conservare a lungo termine e le diluizioni intermedie in HNO_3 2% m/m. Diversamente la diluizione finale da analizzare è stata preparata entro un giorno dall'analisi in NH_4OH 2.8% m/m. E' stato inoltre osservato che, in funzione dei

parametri strumentali applicati durante l'ottimizzazione giornaliera dell'ICP-MS, e a parità di segnale di fondo, gli standard preparati in NH_4OH 2.8% m/m avevano un segnale fino a 1.3 volte più alto rispetto agli stessi standard preparati in HNO_3 2% m/m.

4.2.2.4 Quantificazione Dell'Argento Totale Presente Nelle Medicazioni

Le sei medicazioni sono state disgregate applicando sia il metodo di mineralizzazione sviluppato in sistema aperto, sia quello sviluppato in sistema chiuso. In entrambi i casi, l'Ag è stato quantificato mediante calibrazione esterna e analisi di diluizione isotopica. Il prodotto della digestione è stato conservato a -20°C fino al momento della diluizione in NH_4OH 2.8% m/m che è stata effettuata lo stesso giorno dell'analisi. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 5. La media e la deviazione standard di ogni medicazione sono state ottenute dall'analisi di tre replicati della stessa medicazione preparati indipendentemente. I valori attesi riportati in tabella sono quelli dichiarati dal produttore e indicati nel foglietto illustrativo. Per la maggior parte delle medicazioni, i produttori riportano la concentrazione di Ag presente nel prodotto come massa per unità di superficie. Per convertire questo valore in massa di Ag per massa di prodotto, è stata calcolata empiricamente la densità media di ogni medicazione.

In tutti i prodotti analizzati la concentrazione di Ag quantificata sperimentalmente è molto vicina a quella dichiarata dal produttore. L'Acticoat™ Flex3 ha la più alta concentrazione di Ag tra tutti i prodotti testati: l'Ag rappresenta il 10% circa del peso della medicazione e il valore misurato sperimentalmente è prossimo al limite inferiore dell'intervallo dichiarato dal produttore. La concentrazione di Ag nelle altre medicazioni è molto inferiore: l'Ag rappresenta circa 1 – 2% della massa del Mepilex® Ag e dell'Aquacel® Ag, mentre è pari allo 0.5% della massa delle medicazioni Urgosorb® Ag e Cellosorb® Ag. L'Actisorb® Silver220 contiene la più bassa concentrazione di Ag tra tutti i prodotti testati, ovvero circa lo 0.2%. Questo valore è coerente con quanto osservato attraverso le analisi SEM-EDS durante le quali non è stato possibile rilevare la presenza dell'Ag in questa medicazione. Per tutti i prodotti analizzati, la quantificazione dell'Ag effettuata mediante calibrazione esterna è coerente con i valori ottenuti mediante analisi di diluizione isotopica. Questo indica che entrambi i metodi possono essere utilizzati per determinare accuratamente la concentrazione di Ag in questi prodotti. Sebbene in alcuni casi l'incertezza associata all'analisi in diluizione isotopica sia più alta di quella della quantificazione mediante calibrazione esterna, il valore di ICC è sempre più alto per la quantificazione mediante analisi in diluizione isotopica. Questo dimostra che la precisione analitica dell'analisi in diluizione isotopica è maggiore, e che la principale fonte di incertezza è rappresentata dalla disomogeneità tra i replicati. Negli esperimenti condotti in

questo studio, l'ICC si presenta come un indice utile nel momento in cui è necessario discriminare tra diverse fonti di incertezza per confrontare metodi differenti.

	m/m	p/superficie	ICC
Acticoat™ Flex3	[mg·g ⁻¹]	[mg·cm ⁻²]	
Valore atteso	da 100 a 237	da 0.69 a 1.64	
Sistema aperto CE	129 ± 9	0.890 ± 0.063	0.63
Sistema aperto ADI	119 ± 2	0.822 ± 0.016	0.99
Sistema chiuso CE	119 ± 8	0.827 ± 0.058	0.95
Sistema chiuso ADI	113 ± 14	0.785 ± 0.096	0.97
Actisorb® Silver220	[µg·g ⁻¹]	[µg·cm ⁻²]	
Valore atteso	2.2	33	
Sistema aperto CE	1.65 ± 0.37	26.3 ± 5.9	0.94
Sistema aperto ADI	1.92 ± 0.15	30.7 ± 2.4	0.97
Sistema chiuso CE ^a	2.39 ± 0.64	38.3 ± 10.2	0.99
Sistema chiuso ADI ^a	2.25 ± 0.74	36.1 ± 11.9	0.99
Aquacel® Ag	[mg·g ⁻¹]	[µg·cm ⁻²]	
Valore atteso	12	99	
Sistema aperto CE	10.1 ± 0.9	83.3 ± 7.3	0.74
Sistema aperto ADI	11.4 ± 0.4	94.3 ± 3.0	0.99
Sistema chiuso CE ^a	9.9 ± 0.6	82.1 ± 5.1	0.65
Sistema chiuso ADI ^a	10.0 ± 0.9	82.5 ± 7.5	0.98
Urgosorb® Ag	[mg·g ⁻¹]	[µg·cm ⁻²]	
Valore atteso	5	113	
Sistema aperto CE ^a	1.51 ± 0.29	34.2 ± 6.6	0.99
Sistema aperto ADI ^a	1.49 ± 0.39	33.7 ± 8.8	0.99
Sistema chiuso CE ^a	3.58 ± 0.22	81.1 ± 5.0	0.52
Sistema chiuso ADI ^a	3.38 ± 0.60	76.5 ± 13.6	0.98
Mepilex® Ag	[mg·g ⁻¹]	[mg·cm ⁻²]	
Valore atteso	18	1.2	
Sistema aperto CE	16.2 ± 1.2	1.01 ± 0.07	0.76
Sistema aperto ADI	16.8 ± 1.0	1.05 ± 0.06	0.99
Sistema chiuso CE	16.8 ± 1.6	1.05 ± 0.10	0.57
Sistema chiuso ADI	16.7 ± 1.1	1.05 ± 0.07	0.87
Cellosorb® Ag	[mg·g ⁻¹]	[mg·cm ⁻²]	
Valore atteso	6.6	0.35	
Sistema aperto CE ^a	5.30 ± 0.86	0.281 ± 0.046	0.78
Sistema aperto ADI ^a	5.23 ± 0.84	0.277 ± 0.045	0.92
Sistema chiuso CE ^a	5.38 ± 0.51	0.285 ± 0.027	0.94
Sistema chiuso ADI ^a	5.70 ± 0.87	0.302 ± 0.046	0.99

Tabella 5: Concentrazioni di Ag nelle diverse medicazioni (non corrette per i recuperi) e coefficiente di correlazione intraclasse (ICC) determinato sui diversi metodi e strategie di quantificazione (n=3). CE calibrazione esterna, ADI analisi di diluizione isotopica. Il valore atteso è quello dichiarato dal produttore e riportato nei foglietti illustrativi dei prodotti. ^a I valori riportati sono la somma della frazione disciolta presente nel surnatante e della frazione precipitata ridisciolta in ammoniaca. La deviazione standard è stata calcolata in accordo con la teoria di propagazione dell'errore.

4.3 CONCLUSIONI

Per secoli l'Ag è stato utilizzato come agente antimicrobico per le sue proprietà antibatteriche. In seguito all'insorgenza di resistenze batteriche agli antibiotici, l'Ag è stato rapidamente reintrodotta nei prodotti per la cura di ustioni e ulcere. Nonostante il largo utilizzo, ad oggi sono ancora sconosciuti il comportamento chimico dell'Ag all'interno di una ferita e l'eventuale tossicità nei confronti delle cellule coinvolte nella processo di guarigione. Metodi analitici moderni per la determinazione dell'Ag in matrici complesse quali medicazioni con supporti polimerici e tessuti biologici non sono stati ancora completamente esplorati, e al momento non esistono metodi per lo studio della speciazione dell'Ag.

Il primo nodo è stato sviluppato in questa parte del lavoro: sono stati messi a punto dei metodi per la mineralizzazione di sei medicazioni contenenti Ag ampiamente utilizzate presso i centri ustione di tutto il mondo. Per ogni prodotto è stato messo a punto indipendentemente un metodo di disgregazione in sistema aperto e uno in sistema chiuso (forno a microonde). La concentrazione di Ag è stata poi determinata mediante analisi ICP-MS. L'utilizzo dei metodi di disgregazione in sistema chiuso ha permesso di ottenere recuperi quantitativi per tutti i prodotti, anche se è da sottolineare che in alcuni casi metodi più semplici e meno costosi rappresentano una valida alternativa. L'analisi di diluizione isotopica è stata applicata per validare l'accuratezza dei risultati ottenuti attraverso la calibrazione esterna. Il calcolo del coefficiente di correlazione intraclassa si è dimostrato essere uno strumento utile per confrontare metodi quando non è nota l'omogeneità tra i replicati, come nel caso qui riportato.

Capitolo 5

Nonostante le medicazioni contenenti Ag siano diffusamente impiegate presso i centri ustioni di tutto il mondo, all'inizio di questo progetto di ricerca, la quantità di Ag rilasciata dai prodotti durante il loro utilizzo non era ancora stata valutata in modo sistematico. In letteratura erano presenti pochi lavori riguardanti questo argomento [182-184] e nella maggior parte dei casi il rilascio di Ag veniva stimato utilizzando condizioni sperimentali e soluzioni non in grado di rappresentare il complesso ambiente chimico di una ferita. La maggior parte degli studi, infatti, era stata condotta in acqua ultrapura o all'interno di mezzi di coltura per batteri [185, 186]. In alcuni casi le prove erano state effettuate trasferendo quotidianamente la medicazione all'interno di soluzioni fresche [185, 186], o utilizzando test di dissoluzione dinamici [187]. Queste condizioni sperimentali forzavano il rilascio di Ag da parte della medicazione: la quantità di Ag rilasciata era, quindi, probabilmente sovrastimata rispetto a quella osservabile durante l'applicazione su un paziente che si trova in condizioni statiche. I dati raccolti negli esperimenti risultavano pertanto poco realistici. Inoltre, nella maggior parte degli studi le cinetiche di rilascio ottenute erano basate su pochi punti e su dati la cui riproducibilità non è chiara [182-184].

In questa parte della ricerca è stata valutata la velocità con cui le medicazioni rilasciano l'Ag in diverse soluzioni. Queste soluzioni sono state scelte perché in grado di approssimare dal punto di vista chimico l'ambiente riscontrabile a livello di una ferita o di un'ustione. In questo studio si è, quindi, scelto di valutare le modalità di rilascio dell'Ag avvicinandosi il più possibile alle caratteristiche chimiche dell'ambiente in cui l'Ag si trova ad agire. Lo studio si è focalizzato sulle medicazioni più frequentemente utilizzate presso il Centro Ustioni di Padova, ovvero Acticoat™ Flex3, Mepilex® Ag, Aquacel® Ag, e Actisorb® Silver220. Per tutte le medicazioni, gli esperimenti atti a definire le modalità di rilascio dell'Ag hanno avuto durata pari al tempo massimo di applicazione delle medicazioni dichiarato dai produttori, rispettivamente 3 (Acticoat™ Flex3), 7 (Mepilex® Ag), 14 (Aquacel® Ag) e 7 giorni (Actisorb® Silver220). Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e per ogni studio di cinetica sono state prelevate 12 aliquote. Le soluzioni in cui è stato verificato il rilascio di Ag sono tre: acqua ultrapura, soluzione fisiologica salina (NaCl 0.9% m/v) ed infine un sostituto sierico umano disponibile in commercio contenente albumina, insulina e transferrina umane, in un mezzo utilizzato per colture cellulari umane (HIT Serum substitute, STEMCELL technologies, Vancouver, Canada).

L'acqua ultrapura è la matrice più semplice, mentre la soluzione fisiologica salina presenta una concentrazione di cloruri simili a quella riscontrabile in una ferita [188, 189]. In questo ambiente è probabile che una parte considerevole dell'argento ionico rilasciato dalla medicazione precipiti sotto forma di AgCl. Il sostituto sierico, invece, è stato scelto perché è composto un mezzo di coltura cellulare (quindi contenente anche cloruri) addizionato con albumina, insulina e transferrina umane in concentrazione confrontabile con quella misurata nel siero umano. Questa soluzione è stata utilizzata per verificare se le proteine presenti potessero favorire ed incrementare il rilascio dell'Ag, agendo come complessanti [190] o attraverso la formazione di una "corona" proteica (*protein corona*) [191]. La quantità di Ag rilasciata è stata quantificata mediante analisi ICP-MS e la struttura delle medicazioni è stata caratterizzata prima e dopo gli esperimenti di rilascio mediante analisi SEM – EDS.

5.1 CINETICA DI RILASCIO DELL'ARGENTO E VALUTAZIONE DELLE ALTERAZIONI STRUTTURALI DELLE MEDICAZIONI

5.1.1 PARTE SPERIMENTALE

5.1.1.1 Esperimenti Di Rilascio In Soluzione

La composizione e la struttura delle medicazioni sono descritte nel capitolo 4, paragrafo 4.2. L'omogeneità della distribuzione dell'Ag nella medicazione è stata verificata prelevando 5 campioni dagli angoli e dal centro di ogni medicazione, secondo lo schema riportato in figura 3.

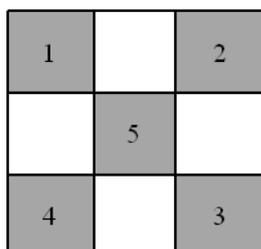


Figura 3: schema del campionamento della medicazione utilizzato per la valutazione della distribuzione dell'Ag. Ogni medicazione è stata tagliata in 9 pezzi secondo uno schema 3X3 e i pezzi che si trovavano negli angoli (1, 2, 3 e 4) e al centro della medicazione (5) sono stati tagliati in frammenti e successivamente mineralizzati.

I pezzi prelevati sono stati tagliati in frammenti. I frammenti generati da ogni porzione di medicazione sono stati mescolati insieme fra loro fino a formare il campione di riferimento da cui è stata prelevata l'aliquota da sottoporre a mineralizzazione acida a caldo in sistema chiuso come descritto nel capitolo 4. I campioni ottenuti dall'Aquacel® Ag sono stati disciolti in NaOH 0.2 M. La concentrazione di Ag è stata quantificata mediante calibrazione esterna utilizzando un ICP-MS modello 7500cx (Agilent Technologies, Tokyo, Giappone).

Per valutare il rilascio di Ag, le medicazioni sono state tagliate in pezzi da 0.3 g che equivalgono a 25 cm² di Acticoat™ Flex3, 4 cm² di Mepilex® Ag, 28 cm² di Aquacel® Ag, e 19 cm² di Actisorb® Silver220. I campioni così ottenuti sono stati trasferiti in vial da 50 mL. L'involucro di nylon presente solo nell'Actisorb® Silver220 è stato rimosso prima degli esperimenti, ed il rilascio di Ag è stato valutato utilizzando solamente la parte interna in rayon di viscosa e carboni attivi. I mezzi scelti per valutare il rilascio di Ag sono stati acqua ultrapura (18 MΩ prodotta dal sistema ELGA Purelab presente nel laboratorio dove ho svolto la tesi), una soluzione salina 0.9% NaCl preparata sciogliendo NaCl grado analitico e privo di Ag in tracce (Sigma–Aldrich, Milano, Italia) in acqua ultrapura. La terza soluzione utilizzata era il sostituto sierico HIT Serum substitute (STEMCELL technologies, Vancouver, Canada). Questo prodotto contiene tre proteine ricombinanti umane, ovvero albumina, insulina e transferrina, in mezzo di coltura IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's medium*). Il prodotto acquistato è stato diluito 5 volte con acqua ultrapura subito prima di essere utilizzato, come indicato dal produttore. Le medicazioni (0.3 g) sono state aggiunte alle soluzioni (30 g) in rapporto 1:100 m/m come già riportato in altri lavori [182, 187]. Ogni esperimento è stato condotto in triplo. Le provette sono state tappate e incubate a 37°C in bagno termostato, in condizioni statiche e per il tempo massimo di applicazione di ogni medicazione. A intervalli regolari di tempo, le soluzioni sono state mescolate delicatamente con la pipetta al fine di omogeneizzare la soluzione senza forzare il rilascio di Ag. Il piano di campionamento è stato deciso singolarmente per ogni medicazione sulla base del tempo massimo di applicazione e basandosi su dati preliminari di rilascio raccolti precedentemente. Per ogni punto sono state prelevate aliquote di 1 mL. Le aliquote prelevate sono state immediatamente congelate e conservate a -20°C. La massa della soluzione è stata mantenuta costante a 30 g sostituendo il peso della soluzione prelevata con un'identica quantità di soluzione fresca. Da ogni provetta sono state prelevate 12 aliquote che sono state accuratamente pesate. Al fine di quantificare solo la concentrazione della frazione solubile e colloidale e rimuovere eventuali precipitati e specie insolubili dell'Ag, le aliquote sono state centrifugate a 14000 rpm per 10 minuti (microcentrifuga 5424, Eppendorf). I campioni sono stati diluiti subito prima dell'analisi, come indicato nel capitolo 4. Le diluizioni

intermedie sono state fatte utilizzando HNO_3 2% m/m per i campioni prelevati dagli esperimenti condotti in acqua ultrapura, mentre è stata utilizzata una soluzione di NH_4OH 2.8% m/m per i campioni prelevati dagli studi di rilascio effettuati in sostituto sierico. La concentrazione di Ag nel surnatante delle aliquote prelevate dagli esperimenti in soluzione salina era talmente bassa da non richiedere diluizioni intermedie. In tutti i casi la diluizione finale è stata preparata in una soluzione di NH_4OH 2.8% m/m immediatamente prima dell'analisi ICP-MS, come descritto nel capitolo 4. Al fine di stimare la quantità totale di Ag rilasciato nelle diverse matrici durante tutto l'esperimento, la medicazione è stata rimossa dalla provetta subito dopo l'ultimo prelievo di soluzione e posta all'interno di una capsula Petri. Alcuni millilitri di ammoniaca concentrata sono stati aggiunti alla soluzione fino ad ottenere una concentrazione finale di NH_4OH pari al 2.8% m/m. Questa concentrazione, infatti, garantisce la solubilizzazione di tutte le forme insolubili dell' Ag^+ , compreso AgCl e Ag legato a proteine insolubili. Le provette sono state agitate vigorosamente utilizzando un agitatore a vibrazione per garantire la completa solubilizzazione di tutti i precipitati. Un'aliquota di alcuni millilitri è stata prelevata e trattata come precedentemente descritto per l'analisi ICP-MS. Durante gli esperimenti di rilascio condotti in sostituto sierico e relativi alla medicazione Mepilex® Ag, si è osservata la formazione di un precipitato fine e biancastro. Un'immagine esemplificativa è riportata in figura 4.



Figura 4: Formazione del precipitato durante gli esperimenti di rilascio di Ag da parte della medicazione Mepilex® Ag in sostituto sierico. Il precipitato è visibile sul fondo della provetta.

Per ottenere maggiori informazioni e chiarire i processi coinvolti, è stato scelto di quantificare l'Ag prima e dopo la solubilizzazione con ammoniaca concentrata. La natura del precipitato è stata, inoltre, valutata utilizzando il reagente Bradford (Sigma–Aldrich, Milano, Italia).

5.1.1.2 Caratterizzazione Della Microstruttura Delle Medicazioni Mediante Analisi SEM-EDS

Al fine di valutare se al termine degli esperimenti di rilascio la microstruttura delle medicazioni fosse cambiata, sono state condotte delle analisi SEM – EDS. I campioni sono stati rimossi dalle provette al termine dell'esperimento, trasferiti all'interno di piastre Petri e asciugati per 24 ore in stufa a 37°C. Le immagini sono state acquisite presso l'ICIS-CNR utilizzando il microscopio Philips XL-40 dotato di rivelatore EDAX, secondo le modalità descritte nel capitolo precedente. Anche in questa serie di analisi, la metallizzazione dei campioni non è stata necessaria.

5.1.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

La concentrazione di Ag all'interno delle medicazioni è stata determinata come massa su massa ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ o $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e successivamente convertita in massa su superficie ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ o $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Per ogni medicazione la concentrazione di Ag presente prima dell'esperimento è in accordo con quanto dichiarato dai produttori. La valutazione della distribuzione dell'Ag sulla superficie della medicazione ha evidenziato che l'Ag è uniformemente distribuito sulla superficie di tutti i prodotti presi in considerazione in questa parte del lavoro. Le immagini SEM – EDS sono state acquisite prima dell'inizio degli esperimenti di rilascio. Al termine dello studio delle cinetiche, le medicazioni sono state nuovamente analizzate mediante SEM-EDS al fine di evidenziare eventuali cambiamenti strutturali. I risultati sono riportati nelle figure 5,6,7 e 8 e vengono discussi unitamente alla variazione della concentrazione di Ag in soluzione in funzione del tempo di incubazione. Le velocità di rilascio dell'Ag da parte delle medicazioni nelle tre matrici è riportata in tabella 6.

La velocità di rilascio è indicata come $\mu\text{g}\cdot(\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2})$ ed è stata ottenuta moltiplicando la concentrazione dell'Ag in soluzione ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) per la massa della soluzione e dividendolo per il tempo trascorso (h) e per l'area superficiale (cm^2) del pezzo di medicazione utilizzato nell'esperimento.

	Acticoat™ Flex3		Mepilex® Ag		Actisorb® Silver220		Aquacel® Ag	
Acqua ultrapura	0-30 min	53	0-15min	4099	0-1.5h	0.22	0-15min	0.18
	30min-2h	10	15-45min	240	1.5h-4gg	0.0006		
	2h-3gg	0.0001	45-7gg	0.33	4-7gg	0.002	15min-14gg	0.0001
Soluzine salina	0-1h	0.04	0-15min	5.82	0-1.5h	0.18	0-15min	3.00
	1-12h	0.008	15-45min	0.11	1.5h-4gg	0.0009		
	12h-3gg	0.0009	45-7gg	0.0014	4-7gg	0.0011	15min-14gg	0.001
Sostituto sierico	0-30 min	161	0-15min	375	0-1.5h	0.56	0-15min	7.85
	30min-2h	2.6	15-45min	8.11	1.5h-4gg	0.11		
	2h-3gg	0.0006	45-7gg	0.11	4-7gg	0.018	15min-14gg	0.05

Tabella 6: velocità di rilascio dell'Ag espressa come $\mu\text{g}\cdot(\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2})$ da parte delle quattro medicazioni in acqua ultrapura, soluzione salina, e sostituto sierico.

In questa parte del lavoro, per maggiore chiarezza, è stato scelto di discutere i dati raccolti suddividendoli per tipologia di medicazione. Al termine degli esperimenti di rilascio per i prodotti analizzati è stata determinata la concentrazione totale di Ag nelle tre matrici e il valore è stato confrontato con quello della frazione solubile. I risultati sono riportati in tabella 7.

	Concentrazione di Ag solubile [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Concentrazione di Ag totale [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
Acticoat™ Flex3		
Acqua ultrapura	65.60 ± 4.29	68.84 ± 5.47
Soluzine salina	0.46 ± 0.05	4.21 ± 1.25
Sostituto sierico	105.13 ± 3.65	107.23 ± 3.73
Mepilex® Ag		
Acqua ultrapura	182.05 ± 0.69	188.64 ± 1.65
Soluzine salina	0.27 ± 0.02	4.49 ± 1.77
Sostituto sierico	18.26 ± 0.97	131.04 ± 4.78
Actisorb® Silver220		
Acqua ultrapura	0.32 ± 0.01	0.30 ± 0.02
Soluzine salina	0.28 ± 0.04	0.27 ± 0.02
Sostituto sierico	3.04 ± 0.02	3.36 ± 0.04
Aquacel® Ag		
Acqua ultrapura	0.07 ± 0.01	73.35 ± 25.78
Soluzine salina	0.99 ± 0.08	13.17 ± 1.59
Sostituto sierico	23.48 ± 0.75	41.01 ± 3.48

Tabella 7: concentrazione di Ag totale e solubile in soluzione al termine degli esperimenti di rilascio

Acticoat™ Flex3

Acticoat™ Flex3 è una delle medicazioni più utilizzate presso i centri ustione di tutto il mondo, incluso quello di Padova, per il trattamento di ustioni [38, 192] e recentemente anche di ferite

croniche [193, 194]. Di tutti i prodotti presi in considerazione in questo lavoro di ricerca, l'Acticoat™ Flex3 è quello che presenta la più alta concentrazione di Ag. L'uniformità del rivestimento di Ag è stata verificata prima degli esperimenti di rilascio mediante analisi SEM (Fig. 5a).

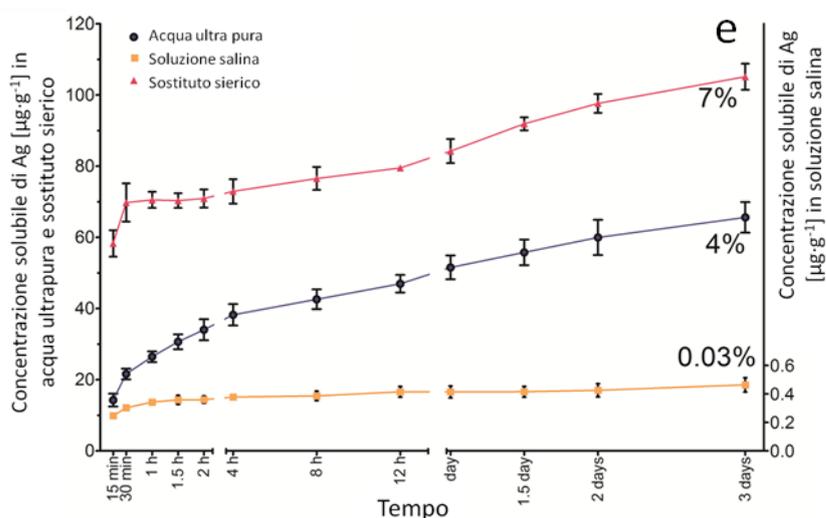
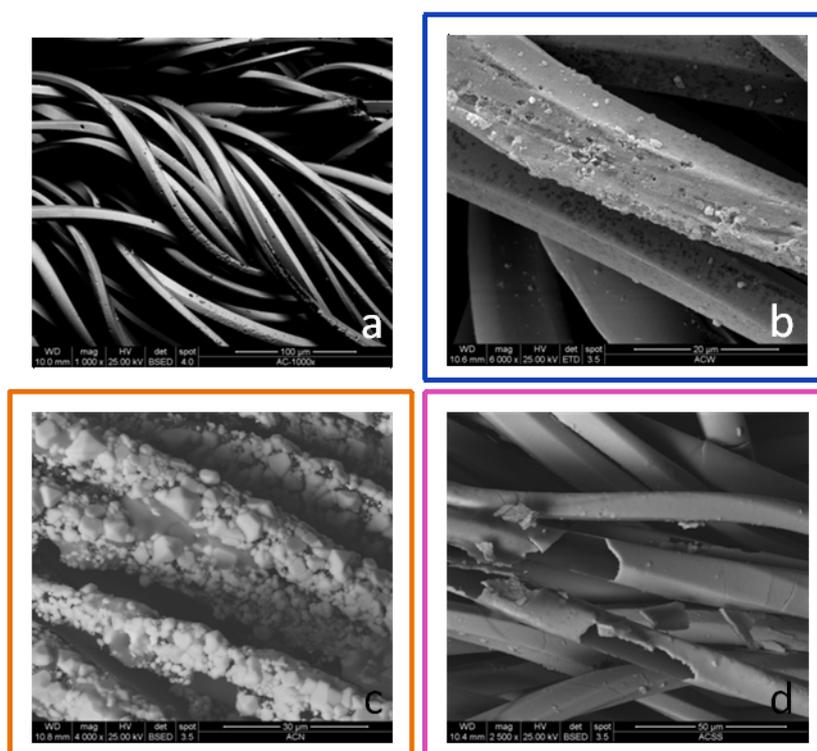


Figura 5: immagini SEM dell'Acticoat™ Flex3 (a) prima degli esperimenti di rilascio, (b-d) dopo gli esperimenti di rilascio in acqua ultrapura, soluzione salina e sostituto sierico umano, rispettivamente. (e) Concentrazione cumulativa di Ag solubile rilasciato da Acticoat™ Flex3 nelle tre matrici in funzione del tempo. I numeri riportati sul grafico rappresentano la frazione soluzione di Ag, espressa come percentuale di tutto l'Ag presente nella medicazione, al termine dell'esperimento.

E' stato inoltre possibile valutare la grandezza dei cristalli presenti sulla superficie del prodotto, e i risultati hanno evidenziato che la loro dimensione varia tra i 200 nm e 450 nm, suggerendo la formazione di aggregati di particelle più piccole durante la deposizione dell'Ag [38]. L'andamento della concentrazione cumulativa di Ag solubile nelle tre matrici in funzione del tempo è riportata in figura 5e.

Durante i primi 30 minuti dell'esperimento in acqua ultrapura viene rilasciata molto velocemente ($53 \mu\text{g}\cdot(\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2})$) una forma solubile di Ag. Il rilascio diminuisce drasticamente nei successivi 90 minuti fino a $10 \mu\text{g}\cdot(\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2})$. Nel periodo compreso tra 24 e 72 ore la concentrazione di Ag in soluzione rimane quasi costante ($60 \pm 6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Nello stesso arco di tempo la concentrazione di Ag in soluzione salina segue un identico andamento ma a valori sempre molto inferiori rispetto a quelli osservati in acqua. Il medesimo trend si osserva nella curva di rilascio in sostituto sierico. In questo caso, però, i valori di concentrazione misurati sono molto più alti, probabilmente a causa della formazione di complessi tra l'Ag e le proteine presenti nel sostituto sierico [195, 196]. I dati suggeriscono che in queste condizioni sperimentali la maggior parte dell'Ag rilasciato si trovi legato alle proteine. Questo consentirebbe all'Ag di restare solubile nonostante la presenza di elevate concentrazioni di Cl^- . Il legame tra proteine e Ag^+ , inoltre, sposta probabilmente l'equilibrio di rilascio rimuovendo l'Ag⁺ libero nella soluzione sotto forma di un complesso solubile, determinando un rilascio continuo di Ag da parte della medicazione [197]. Sebbene l'esperimento sia durato per il tempo massimo di applicazione delle medicazioni, solo una piccola parte di tutto l'Ag presente nella medicazione è stato rilasciato in una forma solubile. Lo studio della distribuzione dell'Ag tra frazione solubile e totale, ha dimostrato che nell'arco di tre giorni tutto l'Ag rilasciato da Acticoat™ Flex3 in acqua ultrapura e nel sostituto sierico si trova in una forma solubile e che la quantità rilasciata rappresenta rispettivamente il 4% e 7% dell'Ag presente nella medicazione. Diversamente, in soluzione salina, solo lo 0.3% dell'Ag presente è rilasciato durante gli esperimenti e solo lo 0.03% è presente nella frazione solubile. Le immagini acquisite durante le analisi SEM, evidenziano come dopo gli esperimenti di rilascio in acqua ultrapura il rivestimento di Ag dell'Acticoat™ Flex3 sia ancora presente, confermando i risultati ottenuti durante gli esperimenti di rilascio.

Il rivestimento appare, inoltre, uniforme e omogeneo, senza particolari alterazioni della struttura della medicazione (figura 5b). Le immagini al SEM dopo i rilasci in soluzione salina evidenziano la presenza di grossi cristalli sulle fibre del prodotto (figura 5c) mentre gli spettri

EDS hanno dimostrato che questi ultimi sono composti da Ag e Cl. Al fine di chiarire la natura chimica dei cristalli, e verificare se fossero composti da AgCl, la medicazione è stata immersa per meno di un minuto in una soluzione di NH_4OH 2.8% m/m e agitata delicatamente per inversione. L'AgCl è, infatti, altamente solubile in NH_4^+ . La successiva analisi ICP-MS della soluzione risultante ha evidenziato come dopo pochi secondi di contatto tra la soluzione di NH_4OH 2.8% m/m e l'Acticoat™ Flex3, 24 mg di Ag, ovvero circa il 60% di tutto l'Ag presente nella medicazione, erano stati rilasciati in soluzione. Il limitato rilascio di Ag osservato in soluzione salina sembra, quindi, essere dovuto alla formazione di cristalli insolubili di AgCl sulla superficie delle fibre. E', quindi, probabile che i cristalli di AgCl formino una barriera che impedisce l'ulteriore formazione e rilascio di ioni Ag^+ nella soluzione e che di fatto inattiva la medicazione [198]. L'importanza di questo risultato è evidente: in un ambiente chimico ricco di Cl^- come quello di una ferita, le specie solubili dell'Ag sono le meno abbondanti e la maggior parte dell'Ag presente si trova intrappolato all'interno della medicazione o sotto forma di AgCl insolubile sulla superficie del prodotto. I risultati ottenuti, inoltre, sono in accordo con le indicazioni di altri autori [199, 200] che scoraggiano fortemente l'utilizzo di soluzione salina per inumidire le medicazioni prima della loro applicazione, e supportano il meccanismo di disattivazione dell'Ag che riduce la disponibilità dell'Ag nell'ambiente chimico della ferita, secondo il modello proposto da Walker et al. [201]. E' interessante notare come dopo gli esperimenti di rilascio nel sostituto sierico umano, il rivestimento dell'Acticoat™ Flex3 si stacca in alcuni punti in tutto il suo spessore esponendo le fibre di poliestere sottostanti (figura 5d). Queste rotture potrebbero, inoltre, spiegare parzialmente la maggiore concentrazione di Ag osservata durante gli esperimenti di rilascio in questa matrice.

Mepilex® Ag

Le immagini al SEM del Mepilex® Ag mostrano la struttura porosa della schiuma poliuretanicca ed evidenziano la presenza di grandi cristalli depositati sulla superficie (figura 6a). Come già descritto nel capitolo 4, l'analisi EDS dimostra la presenza di Ag, S e O suggerendo che questi cristalli siano composti principalmente da Ag_2SO_4 . Ingrandendo l'immagine è stato possibile osservare anche la presenza di cristalli più piccoli con la stessa composizione e affossati all'interno della struttura del prodotto. La cinetica di rilascio di Ag del Mepilex® Ag è stata studiata per una settimana, pari al tempo massimo di applicazione di questa medicazione suggerito dal produttore, ed è riportata in figura 6e. Attraverso questo studio è stato dimostrato che entro 5 minuti dall'inizio dell'esperimento, il Mepilex® Ag rilascia in acqua

ultrapura oltre il 50% dell'Ag presente nel prodotto in una forma solubile. Dopo 90 minuti, il valore sale al 96% e la concentrazione di Ag in soluzione raggiunge i $182 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. La determinazione dell'Ag totale conferma che in acqua ultrapura la medicazione rilascia tutto l'Ag nella frazione solubile. Come già osservato per l'Acticoat™ Flex3, anche nel caso del Mepilex® Ag, la quantità di Ag solubile rilasciata in soluzione salina è minima e rappresenta solo lo 0.15% di tutto l'Ag presente nel prodotto. I risultati dimostrano che nell'arco di 120 minuti la concentrazione di Ag solubile aumenta fino a $0.26 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e successivamente rimane costante fino alla fine dell'esperimento.

La determinazione dell'Ag totale al termine dell'esperimento in soluzione salina ha evidenziato che solo il 2.5% di tutto l'Ag presente nel Mepilex® Ag è stato rilasciato dalla medicazione. Gli esperimenti di rilascio condotti in sostituto sierico, hanno evidenziato che il Mepilex® Ag rilascia in sostituto sierico il 67% del tutto l'Ag presente all'interno della medicazione con un profilo simile a quello riscontrato nelle altre due matrici.

La concentrazione di Ag in soluzione alla fine dell'esperimento era pari a $131 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Già dopo 24 ore dall'inizio dell'esperimento, la soluzione di rilascio appariva torbida. Trascorsi 7 giorni, dopo aver centrifugato la soluzione in cui era stato effettuato l'esperimento, è stato osservato un precipitato bianco. È stata determinata la concentrazione di Ag nel surnatante, mentre il precipitato bianco è stato risolubilizzato in 1mL di NH_4OH concentrato. Nel surnatante la concentrazione di Ag misurata era pari a $18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, e corrispondeva al 14% di tutto l'Ag rilasciato. Diversamente la concentrazione di Ag nel precipitato era pari $114 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e rappresentava l'88% di tutto l'Ag rilasciato nel corso dell'esperimento. Successivamente si è deciso di approfondire la natura chimica del precipitato e di chiarire se contenesse proteine denaturate o AgCl. È, infatti, ben noto in chimica clinica che l'aggiunta di Ag_2SO_4 a campioni di siero umano può provocare l'intorbidimento della soluzione dovuto alla denaturazione delle proteine [202]. Questo fenomeno poteva facilmente spiegare la torbidità e la presenza di precipitato bianco osservate nei campioni di sostituto sierico al termine degli esperimenti. Per confermare questa ipotesi, dopo la rimozione del surnatante, il precipitato bianco è stato ridissolto in tampone Tris-HCl e addizionato con il reagente di Bradford. Immediatamente dopo l'aggiunta, la soluzione ha cambiato colore virando verso un blu intenso, dimostrando che il precipitato aveva origine proteica. Le verifiche effettuate hanno, quindi, dimostrato che il precipitato bianco osservato al termine dell'esperimento di rilascio era caratterizzato da un elevato contenuto di proteine e di Ag, probabilmente legati insieme. La struttura porosa del Mepilex® Ag osservata attraverso le analisi SEM può facilmente spiegare perché tra tutte le medicazioni oggetto di questo studio, il Mepilex® Ag è il prodotto che presenta la più alta

velocità di rilascio in tutte le matrici. Considerata la velocità con cui il Mepilex® Ag rilascia il principio attivo, è sconsigliabile utilizzare questa medicazione quando è richiesto un rilascio continuo e prolungato nel tempo.

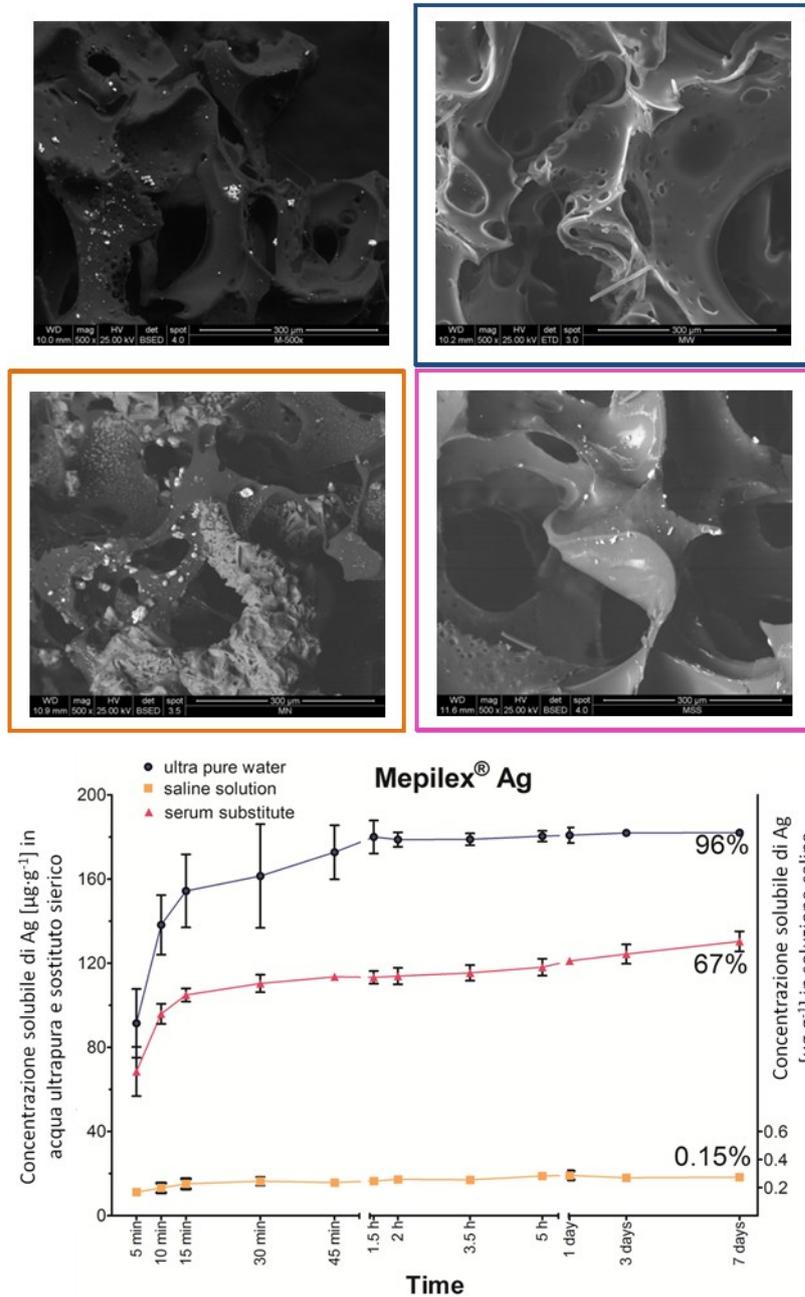


Figura 6: immagini SEM del Mepilex® Ag (a) prima degli esperimenti di rilascio, (b-d) dopo gli esperimenti di rilascio in acqua ultrapura, soluzione salina e sostituto sierico umano, rispettivamente. (e) Concentrazione cumulativa di Ag solubile rilasciato da Acticoat™ Flex3 nelle tre matrici in funzione del tempo. I numeri riportati sul grafico rappresentano la frazione soluzione di Ag, espressa come percentuale di tutto l'Ag presente nella medicazione, al termine dell'esperimento.

Le immagini al SEM acquisite al termine degli esperimenti di rilascio hanno confermato i risultati delle analisi ICP-MS: in figura 6b è possibile osservare l'assenza di cristalli di Ag_2SO_4

all'interno del Mepilex® Ag dopo 7 giorni in acqua ultrapura. Grossi cristalli contenente Ag e Cl sono presenti, invece, sulla superficie della medicazione dopo gli esperimenti di rilascio in soluzione salina (figura 6c). Per verificare che i cristalli osservati fossero composti di AgCl, la medicazione è stata immersa per alcuni secondi in 30 g di una soluzione NH₄OH al 2.8% m/m. La soluzione risultante è stata analizzata mediante ICP-MS e i risultati hanno evidenziato che l'80% dell'Ag totale presente nella medicazione veniva rilasciato in soluzione in meno di un minuto. I risultati, quindi, confermano che, quando il Mepilex® Ag viene immerso in soluzione salina, la maggior parte dell'Ag presente precipita come AgCl. Questo risultato, sebbene atteso, è molto interessante perché dimostra come il processo sia estremamente rapido al punto che l'Ag precipita all'interno della struttura porosa della medicazione senza avere il tempo di passare in soluzione. Infine le immagini SEM del Mepilex® Ag dopo gli esperimenti di rilascio in sostituto sierico (figura 6d) evidenziano la presenza di alcuni cristalli residui contenenti Ag all'interno della medicazione.

Actisorb® Silver220

Le immagini al SEM dell'Actisorb® Silver220 mostrano la sua struttura fibrosa (figura 7a). Questo prodotto presenta la più bassa concentrazione di Ag tra tutte le medicazioni studiate, ed è specificatamente sviluppato per il trattamento di ferite infette e maleodoranti [203]. Dalle immagini al SEM, particelle o sali di argento non sono visibili sulla superficie delle fibre pertanto si ritiene che siano intrappolati all'interno della matrice. Come già osservato per l'Acticoat™ Flex3, il rilascio maggiore avviene nel sostituto sierico mentre in soluzione salina è stata quantificata la più bassa concentrazione di Ag. I risultati sono riportati in figura 7e. In acqua ultrapura, l'Ag è quantificabile già dopo 20 minuti dall'inizio dell'esperimento. La concentrazione dell'Ag aumenta nei successivi 70 minuti fino a raggiungere il valore di 0.21 µg·g⁻¹. Nel corso delle prime 24 ore la concentrazione raggiunge un plateau e rimane costante fino al quarto giorno. Un piccolo aumento della concentrazione di Ag si osserva al quinto giorno: il valore misurato era, infatti, pari a 0.27 µg·g⁻¹. Un successivo incremento di concentrazione fino al valore di 0.31 µg·g⁻¹ di Ag è stato osservato nell'ultima parte dell'esperimento. La concentrazione di Ag solubile in soluzione salina segue un andamento simile a quello osservato in acqua ultrapura: dopo una fase iniziale di incremento, la velocità di rilascio raggiunge un valore prossimo a zero e la concentrazione rimane costante fino al quinto giorno. A partire dal quinto giorno, il rilascio di Ag riprende e la concentrazione di Ag solubile aumenta leggermente. Diversamente, all'interno del sostituto sierico la velocità di rilascio è stata pari a 0.56 µg·(h⁻¹·cm⁻²) durante la prima ora e mezza di esperimento, e successivamente

è stata osservata una diminuzione fino a $0.11 \mu\text{g}\cdot(\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2})$. Per tutta la rimanente parte dell'esperimento il rilascio è continuato con una velocità pari a $0.018 \mu\text{g}\cdot(\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2})$, portando così all'incremento della concentrazione di Ag solubile nel sostituto sierico. Al settimo giorno la concentrazione di Ag solubile era ancora in aumento.

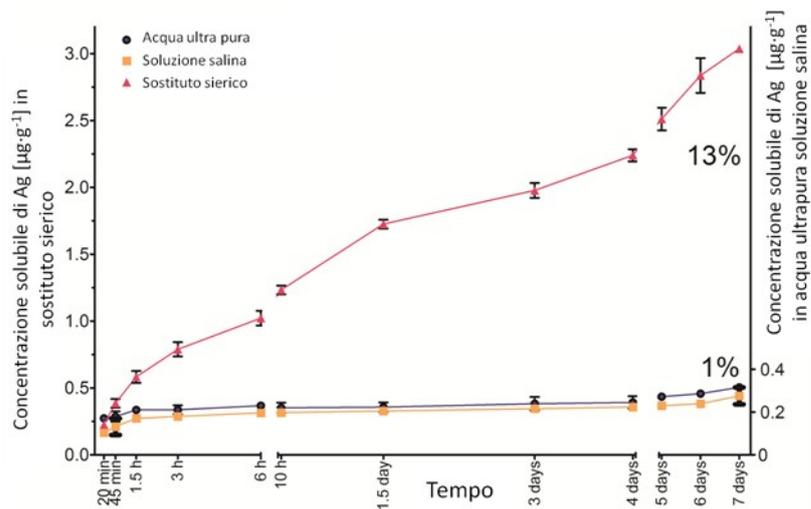
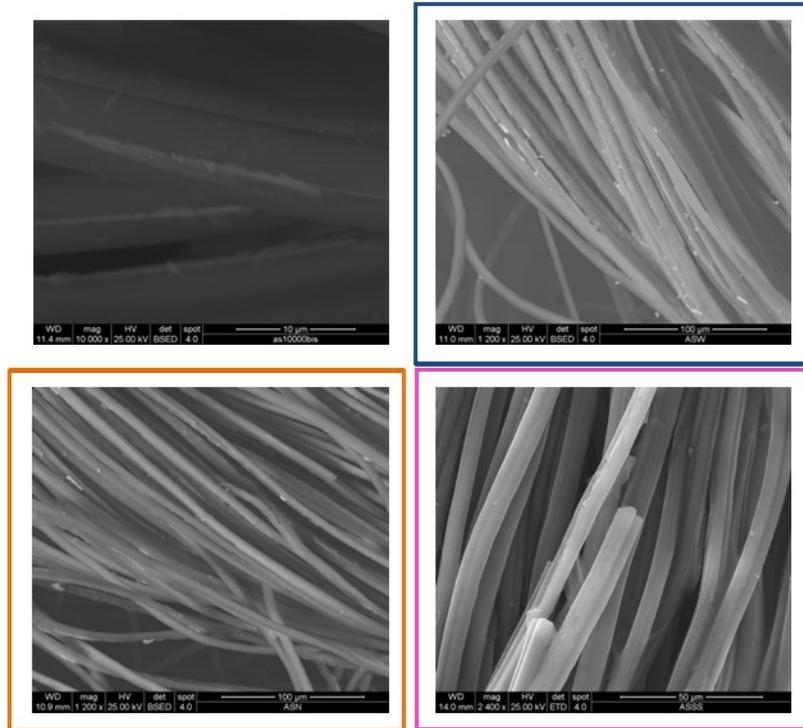


Figura 7: immagini SEM dell'Actisorb® Silver220 (a) prima degli esperimenti di rilascio, (b-d) dopo gli esperimenti di rilascio in acqua ultrapura, soluzione salina e sostituto sierico umano, rispettivamente. (e) Concentrazione cumulativa di Ag solubile rilasciato da Acticoat™ Flex3 nelle tre matrici in funzione del tempo. I numeri riportati sul grafico rappresentano la frazione soluzione di Ag, espressa come percentuale di tutto l'Ag presente nella medicazione, al termine dell'esperimento

L'aspetto delle curve riportate in figura 7e, suggerisce che avvengano due diversi meccanismi di rilascio: è stato ipotizzato che il rilascio veloce osservato durante le prime 6 ore di esperimento rappresenti il rilascio dell'Ag presente sulla parte più superficiale delle fibre.

Il processo potrebbe essere anche accelerato dalla presenza delle proteine. Diversamente, la seconda parte della curva potrebbe indicare il rilascio dell'Ag presente nella parte più interna delle fibre della medicazione, dopo che questo è migrato dal centro verso la superficie. Questi dati indicano che l'Actisorb® Silver220 è caratterizzato da un rilascio di Ag più controllato rispetto a Acticoat™ Flex3 e Mepilex® Ag.

Al termine dell'esperimento relativo all' Actisorb® Silver220, la frazione di Ag solubile in acqua e in soluzione salina rappresentava la quasi totalità dell'Ag rilasciato, mentre nel sostituto sierico la quantità di Ag solubile misurato in soluzione era pari al 90% del totale. Infine, la quantità di Ag totale determinato nelle tre matrici rappresentava rispettivamente l'1%, 1% e 13% di tutto l'Ag contenuto all'interno della medicazione. Le immagini al SEM acquisite al termine degli esperimenti di rilascio dimostrano che la struttura dell'Actisorb® Silver220 non è cambiata significativamente (figura 7b-d).

Aquacel® Ag

Nelle immagini al SEM le fibre di carbossimetilcellulosa che compongono la struttura dell' Aquacel® Ag sono chiaramente visibili (figura 8a). Gli esperimenti di rilascio in soluzione relativi all'Aquacel® Ag hanno avuto durata pari a 14 giorni poiché questo è il tempo massimo di applicazione dichiarato dal produttore. Durante gli esperimenti di rilascio è stato osservato che nel momento in cui l'Aquacel® Ag veniva posto a contatto con i liquidi, la medicazione diventava gelatinosa e andava incontro a pesanti alterazioni strutturali che dipendevano strettamente dalla natura del liquido aggiunto. L'Aquacel® Ag contiene al suo interno Na⁺ e Cl⁻ [204] ed è stato sviluppato con lo scopo di creare una medicazione capace di assorbire gli essudati della ferita e intrappolare i batteri nel gel. Purtroppo però con la trasformazione in gel la medicazione si rompe facilmente e risulta difficile da maneggiare e rimuovere [205]. In acqua ultrapura, ad esempio, la medicazione perde la sua integrità molto rapidamente, ed è possibile osservare la perdita di fibre e piccoli frammenti gelatinosi. Probabilmente l'assenza di sali in acqua ultrapura promuove il trasferimento di sali dalla medicazione alla matrice liquida, e questo a sua volta determina l'alterazione della struttura e la conseguente frammentazione. La massa che si stacca dal prodotto aumenta durante i 14 giorni di esperimento ed è facilmente riconoscibile dopo la centrifugazione delle aliquote prelevate.

Durante tutto il corso dell'esperimento, il rilascio di Ag in acqua ultrapura (figura 8e) è stato costante ed estremamente basso, se si considera la concentrazione di Ag nella medicazione. Il valore di concentrazione di Ag solubile in acqua ultrapura si è mantenuto sempre pari a $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

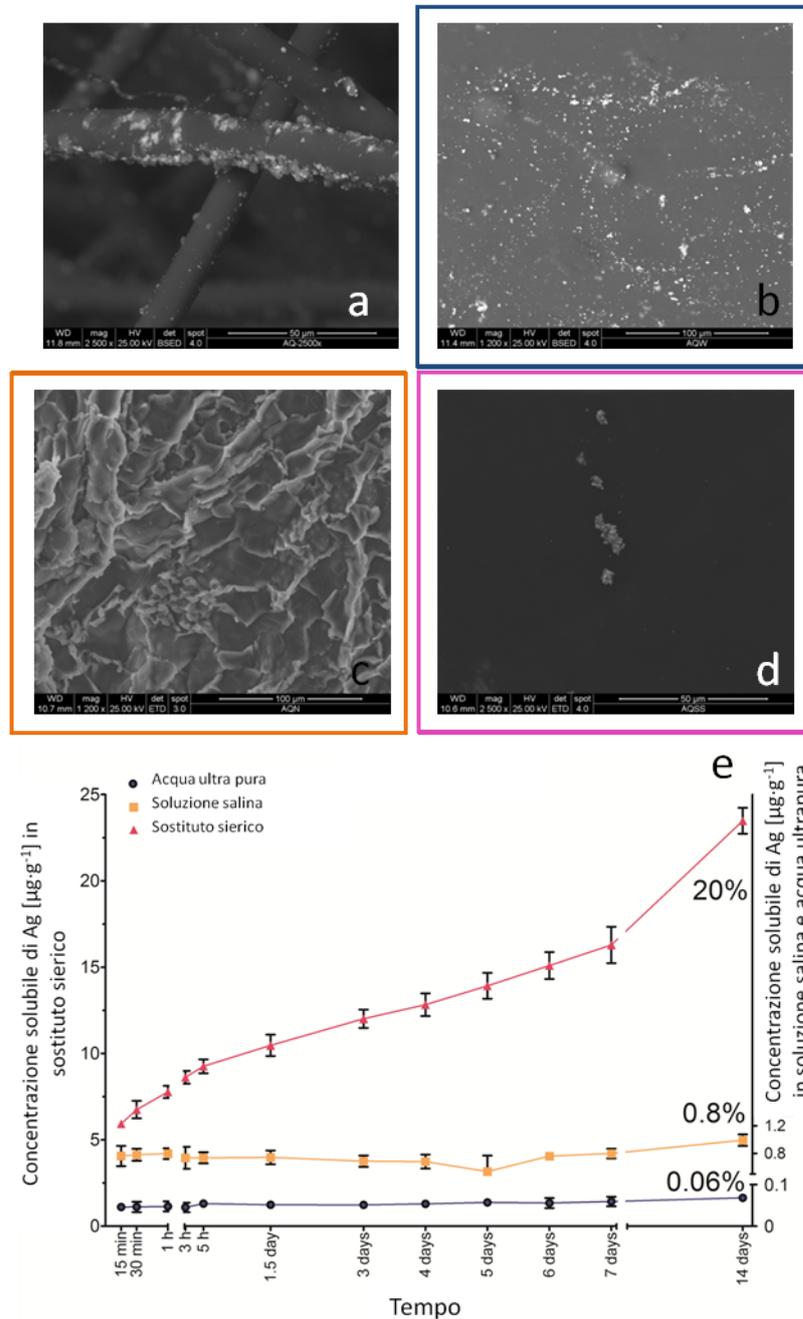


Figura 8: immagini SEM dell' Aquacel® Ag (a) prima degli esperimenti di rilascio, (b-d) dopo gli esperimenti di rilascio in acqua ultrapura, soluzione salina e sostituto sierico umano, rispettivamente. (e) Concentrazione cumulativa di Ag solubile rilasciato da Acticoat™ Flex3 nelle tre matrici in funzione del tempo. I numeri riportati sul grafico rappresentano la frazione soluzione di Ag, espressa come percentuale di tutto l'Ag presente nella medicazione, al termine dell'esperimento

La principale differenza con le altre medicazioni prese in considerazione in questo lavoro è che la concentrazione di Ag solubile misurata in soluzione salina è 14 volte superiore a quella misurata in acqua ultrapura. Questo risultato può essere facilmente spiegato se si considera che l'Aquacel® Ag contiene all'interno della sua struttura un'elevata concentrazione di ioni Cl⁻. E' ben noto che ad elevate concentrazioni di Cl⁻, il sale insolubile AgCl comincia a ridissolversi a causa della formazione di clorocomplessi anionici solubili quali AgCl₂⁻, AgCl₃²⁻ e AgCl₄³⁻. Inoltre, durante gli esperimenti di rilascio in soluzione salina, la struttura della medicazione non si perde completamente ma il prodotto mantiene la sua forma e appare meno amorfo rispetto a quando si trova immerso in acqua ultrapura.

La presenza di NaCl a concentrazioni fisiologiche all'interno della soluzione probabilmente riduce il trasferimento di sali dall'Aquacel® Ag alla matrice liquida, limitando in questo modo l'alterazione della struttura della medicazione. Come riportato in figura 8e, in soluzione salina la concentrazione di Ag solubile passa da un valore iniziale di 0.76 µg·g⁻¹ a un valore finale di 0.99 µg·g⁻¹. Infine, le analisi ICP-MS hanno dimostrato che in sostituto sierico l'Aquacel® Ag rilascia nella frazione solubile approssimativamente il 20% di tutto l'Ag presente nella medicazione e che al termine dell'esperimento il rilascio da parte della medicazione è ancora in corso. Macroscopicamente, all'interno del sostituto sierico, l'Aquacel® Ag ha un comportamento simile a quello osservato in soluzione salina. Il sostituto sierico contiene diversi sali in concentrazione simile a quella fisiologica del siero umano, ed è quindi probabile che il sostituto sierico rappresenti per l'Aquacel® Ag un mezzo conservativo che non provoca alterazioni pesanti nella struttura del prodotto.

La quantità totale di Ag rilasciata nelle tre matrici è stata determinata al termine dei 14 giorni, ed è riportata in tabella 6. Nel sostituto sierico la concentrazione di Ag totale misurata era 41.1 µg·g⁻¹, 1.7 volte più alta di quella quantificata nella frazione solubile. In soluzione salina, invece, la frazione totale è 13 volte più alta della frazione solubile. E' interessante notare che in acqua ultrapura la concentrazione di Ag nella frazione totale è tre ordini di grandezza più elevata di quella misurata nella frazione solubile. L'elevata concentrazione di Ag nella frazione totale misurata alla fine degli esperimenti nelle tre matrici può essere spiegata dal fatto che le fibre di sodio carbossimetilcellulosa si dissolvono rapidamente in soluzioni alcaline e, quindi, nel momento in cui l'ammoniaca concentrata è stata aggiunta alla soluzione in cui era stato condotto il rilascio, i pezzi di Aquacel® Ag che si erano staccati si sono immediatamente dissolti. Questo spiega anche perchè la concentrazione più elevata di Ag è stata quantificata nella matrice dove si è osservata la maggiore frammentazione del prodotto.

Al termine degli esperimenti di rilascio, l'Aquacel® Ag è stato asciugato in forno a 37° C per 24 ore. Le immagini al SEM, acquisite una volta asciugata la medicazione, hanno confermato quanto osservato durante gli esperimenti di rilascio: dopo 14 giorni in acqua ultrapura pesanti alterazioni strutturali hanno avuto luogo nell'Aquacel® Ag. Il prodotto, infatti, si è trasformato in un materiale amorfo, rigido, grigio e sottile. In figura 8b è possibile osservare la presenza di numerosi cristalli, nei quali la presenza di Ag è stata confermata dagli spettri EDS. Le immagini acquisite al SEM della medicazione dopo i rilasci in soluzione salina (figura 8c) e sostituto sierico (figura 8d) hanno dimostrato che la struttura del prodotto non è completamente collassata ma si è trasformata in qualcosa di diverso con un contenuto molto meno abbondante di Ag, confermando le osservazioni fatte durante gli esperimenti di rilascio e le analisi ICP-MS.

I risultati ottenuti in questo lavoro hanno dimostrato che già dopo un giorno all'interno del sostituto sierico le medicazioni Acticoat™ Flex3, Mepilex® Ag e Aquacel® Ag rilasciano una quantità di Ag sufficiente a raggiungere la concentrazione di Ag minima necessaria per inibire la crescita dei microrganismi patogeni più frequentemente riscontrati nelle ferite infette, ovvero *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Staphylococcus aureus* MRSA, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli* e *Candida spp* [206-210]. Diversamente, nello stesso arco di tempo, l'Actisorb® Silver220 non rilascia una quantità di Ag solubile sufficiente per eliminare *Acinetobacter spp*. Al termine del tempo massimo di applicazione di ogni medicazione, nessuno dei prodotti studiati in questo lavoro rilascia in soluzione salina una quantità di Ag solubile sufficiente per uccidere i microrganismi sopracitati. Alla luce di questi risultati è, quindi, consigliabile evitare di inumidire le medicazioni con soluzione salina, al fine di preservare l'attività e le proprietà antibatteriche dell'Ag.

5.2 CASO DI STUDIO: QUANTITÀ DI ARGENTO RESIDUO IN MEDICAZIONI DOPO IL LORO UTILIZZO

In questa parte del lavoro è stata valutata la corrispondenza tra la quantità di Ag rilasciata in soluzione con la quantità di Ag rilasciata durante l'applicazione delle medicazioni su pazienti ustionati. A tale scopo è stato scelto di analizzare dei pezzi di Acticoat™ Flex3 prelevato al termine dell'applicazione su due diversi pazienti. La scelta è ricaduta sull'Acticoat™ Flex3 perchè questa medicazione è la più utilizzata presso il centro ustioni di Padova, grazie alla sua

facilità di utilizzo e alla sua comprovata efficacia nel favorire la guarigione delle ferite. Sebbene questa medicazione sia ampiamente usata presso i centri ustione di tutto il mondo, al momento della realizzazione di questa ricerca non erano disponibili in letteratura informazioni relative al rilascio, al trasporto e all'escrezione delle AgNPs dopo l'applicazione della medicazione. Inoltre, ad oggi non sono ancora stati messi a punto metodi standardizzati riconosciuti a livello internazionale per lo studio della tossicità e della biocompatibilità dell'Ag nanoparticellare [211]. E' stato recentemente dimostrato che sebbene le nanoparticelle di Ag siano caratterizzate da un'attività antibatterica inferiore a quella dell'Ag⁺, presentano un'elevata capacità di penetrare le membrane cellulari e di distribuirsi all'interno del corpo [46, 212].



Figura 9: Campionamento dell'Acticoat™ Flex3 dopo il suo utilizzo. (a) Applicazione di Acticoat™ Flex3 su un paziente, (b) medicazione prelevata dopo 3 giorni di applicazione sul paziente 1; (c) medicazioni prelevate dal paziente 2 al termine dell'utilizzo. Nelle immagini (b) e (c) sono visibili i *punch* (diametro interno 6 mm) con cui sono stati prelevati i sottocampioni e sono indicate le zone campionate e corrispondenti a ferite di differente gravità.

Avere una stima realistica della quantità di Ag che viene rilasciata da questa medicazione durante le sua applicazione è un'informazione chiave, soprattutto se si considera il numero di AgNPs presenti sulla superficie dell'Acticoat™ Flex3. All'inizio di questo progetto di ricerca, la messa a punto di una strategia di quantificazione dell'Ag effettivamente rilasciato dall'Acticoat™ Flex3 all'interno del corpo umano rappresentava una sfida scientifica impegnativa poichè gli unici dati disponibili in letteratura erano quelli relativi alla concentrazione di Ag nel siero dei pazienti trattati e che, quindi, fornivano delle informazioni limitate e indirette [14, 213].

I metodi qui proposti offrono la possibilità di stimare la quantità di Ag effettivamente rilasciata nei pazienti determinando la quantità di Ag residuo ancora presente nell' Acticoat™ Flex3 dopo il suo utilizzo. Questo implica che per la prima volta è stato messo a punto un metodo che rende possibile la stima della quantità di Ag assorbita dai pazienti trattati.

5.2.1 PARTE SPERIMENTALE

In questo studio pilota, due pezzi di Acticoat™ Flex3 sono stati prelevati da due diversi pazienti al momento del cambio della medicazione, ovvero dopo tre giorni di utilizzo. I campioni sono stati conservati a -20° C all'interno di buste di carta. Da ogni medicazione sono stati prelevati diversi pezzetti utilizzando un dispositivo per il prelievo di biopsie cutanee (*punch*, figure 9b e 9c). L'utilizzo di questo strumento ha permesso di prelevare dei replicati con la medesima area superficiale, pari a 113 mm².

Osservando le medicazioni sono state identificate aree dall'aspetto molto diverso. Per questo motivo è stato deciso di prelevare 3 sottocampioni da ogni area identificata, ovvero:

- zone apparentemente pulite corrispondenti alla parte della medicazione che si trovava a contatto con la pelle integra presente ai bordi dell'ustione.
- Una zona gialla corrispondente alla parte della medicazione che era stata a contatto con essudati sierosi. L'essudato sieroso si forma tipicamente nelle ustioni superficiali poco infiammate, e si presenta come un liquido chiaro, giallognolo a basso contenuto di proteine.
- Una zona bianca caratterizzata dalla presenza di un essudato di tipo purulento, caratteristico delle ustioni profonde e delle gravi infezioni. L'essudato purulento si presenta come un liquido bianco, lattiginoso ed è costituito da plasma con neutrofili sia attivi che morti, da fibrinogeno e cellule necrotiche parenchimali.

- Una zona rossa in cui era presente dell'essudato emopurulento. La presenza di questo essudato è indice di una ferita aperta, infetta e caratterizzata da danno capillare. I globuli rossi sono i principali componenti del liquido.

Per ogni area identificata sono stati prelevati tre replicati e singolarmente posti all'interno di piastre Petri, come indicato nello schema in figura 10.

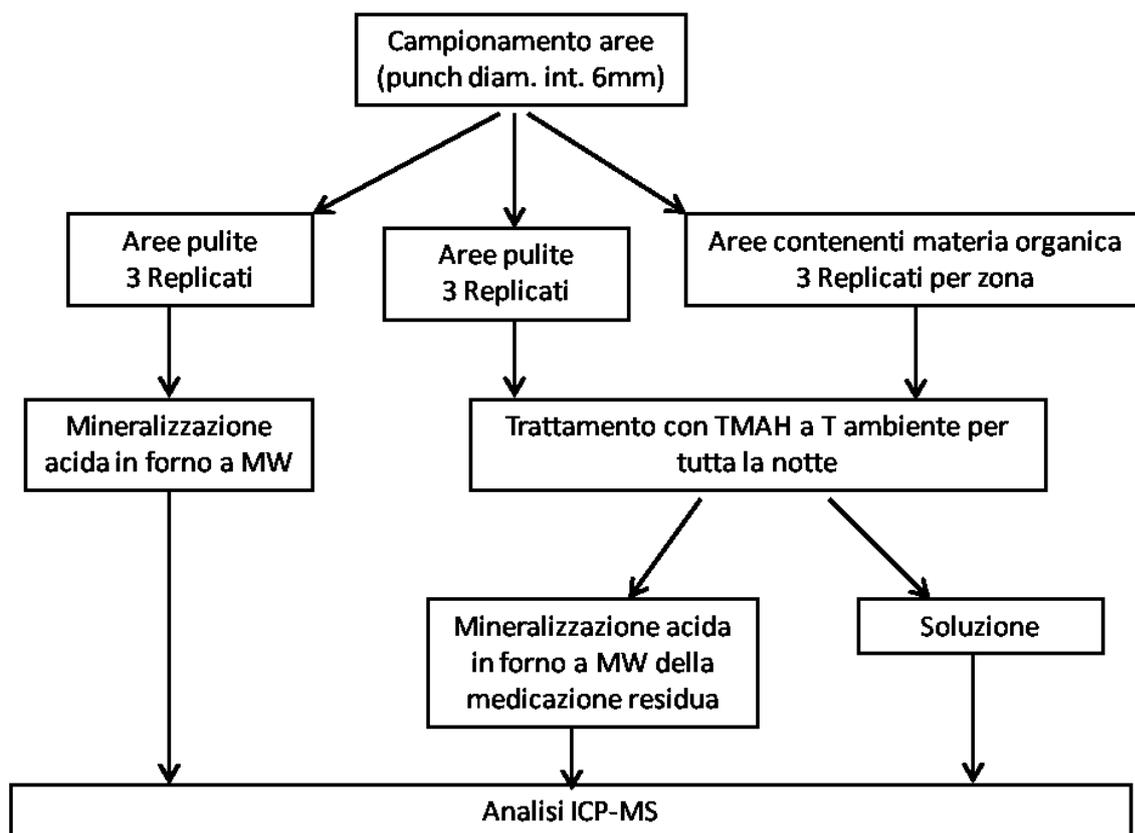


Figura 10: schematizzazione del piano sperimentale adottato nella quantificazione dell'Ag presente nella medicazione Acticoat™ Flex3 dopo il suo utilizzo

I replicati sono stati, quindi, trattati con TMAH (tetrametilammonio idrossido) per tutta la notte a temperatura ambiente (25° C) in condizioni statiche con lo scopo di rimuovere la materia organica attaccata alla medicazione. Il mattino successivo, al termine della digestione alcalina, i campioni di Acticoat™ Flex3 sono stati recuperati e mineralizzati in sistema chiuso con il metodo messo a punto e descritto nel capitolo 4. Il prodotto della mineralizzazione acida e della digestione alcalina sono stati diluiti in NH₄OH 2.8% m/m e la concentrazione di Ag totale è stata quantificata mediante analisi ICP-MS. La quantità di Ag che era ancora presente nella medicazione rappresenta l'Ag che non è stato rilasciato. La quantità di Ag presente nella soluzione di TMAH rappresenta, invece, l'Ag che è uscito dalla medicazione e che ha agito

probabilmente *in situ* come antibatterico ma che è stato poi rimosso insieme alla medicazione senza entrare nel circolo sanguigno del paziente. La differenza tra la concentrazione totale di Ag presente nell'Acticoat™ Flex3 prima del suo utilizzo e la somma dell'Ag nelle due frazioni (residua e TMAH) può essere considerato una stima della quantità di Ag che è stata rilasciata nel paziente. Sei replicati sono stati prelevati da un'area pulita: tre replicati sono stati sottoposti a trattamento con TMAH e successivamente mineralizzati, mentre i restanti tre replicati sono stati mineralizzati direttamente in forno a microonde. Questi ultimi replicati sono stati utilizzati come campioni di riferimento per valutare l'accordanza tra la quantità di Ag stimata attraverso la somma delle due frazioni (TMAH e residua) e la quantità di Ag effettivamente presente in quella parte della medicazione. Infine, tre replicati sono stati prelevati da una medicazione nuova e sottoposti a digestione alcalina con TMAH per verificare se questa procedura potesse portare alla solubilizzazione delle AgNPs dalle fibre dell'Acticoat™ Flex3.

5.2.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati hanno dimostrato che la differenza tra la quantità di Ag stimata attraverso la somma delle due frazioni (TMAH e residua) e la quantità di Ag effettivamente presente nella medicazione è inferiore al 10%. La digestione con TMAH condotta sui pezzi di medicazione nuova ha evidenziato come il trattamento basico determini una parziale dissoluzione dell'Ag. Il valore medio trovato era pari al $13 \pm 8\%$. Pertanto, nell'interpretazione dei dati relativi ai campioni dopo l'utilizzo, questa percentuale va sottratta alla frazione TMAH e aggiunta alla frazione residua. Nella tabella 8 è riportata la percentuale di Ag trovata nella frazione TMAH e all'interno della medicazione, mentre la quantità rilasciata nel paziente è stata calcolata per differenza.

Sebbene la variabilità tra i diversi replicati sia piuttosto elevata a causa della composizione eterogenea del campione, si possono ricavare alcune importanti informazioni. Non sono state trovate significative differenze tra la concentrazione di Ag nella frazione TMAH dei campioni prelevati dall'area pulita e dei campioni prelevati dal nuovo Acticoat™ Flex3. Questo conferma che le aree pulite osservate nella medicazione usata non contengono materia organica, o che l'eventuale materia organica presente non contiene Ag. Inoltre nella parte di Acticoat™ Flex3 che si trovava a contatto con la cute sana, è stata quantificata una concentrazione residua di Ag pari al 60-70% dell'Ag inizialmente presente e che corrisponde, quindi, a un rilascio del 30-40%. I campioni prelevati dalle aree bianche e gialle presentano la più bassa concentrazione di Ag residuo all'interno della medicazione, circa il 25-30%, mentre una quantità significativa (20-

30% di tutto l'Ag presente) è stata rilasciata all'interno della materia organica e rimossa insieme all'Acticoat™ Flex3.

	Frazioni			
	TMAH ^a	RESIDUA	TMAH + RESIDUA	PAZIENTE
Paziente / medicazione 1				
Area pulita	14 ± 4	58 ± 11	72 ± 12	28 ± 12
Area bianca	41 ± 2	17 ± 5	58 ± 6	42 ± 6
Paziente / medicazione 2				
Area pulita	11 ± 1	47 ± 14	57 ± 12	43 ± 12
Area rossa	14 ± 4	24 ± 3	38 ± 6	62 ± 6
Area gialla	31 ± 3	10 ± 1	41 ± 4	59 ± 4

Tabella 8: Percentuale di Ag (in riferimento alla medicazione nuova) quantificata nella frazione TMAH e nella frazione residua della medicazione Acticoat™ Flex3 dopo il suo utilizzo. La percentuale di Ag rilasciata nel paziente è stata calcolata per differenza (n=3). a La percentuale di Ag rilasciata dalla medicazione nuova è pari a 13 ± 8%.

Nelle aree rosse, la percentuale di Ag nella frazione TMAH è trascurabile e la quantità di Ag che rimane all'interno della medicazione è pari a circa il 40%. Conseguentemente la percentuale di Ag rilasciata all'interno del paziente è compresa tra il 40% e il 60% in riferimento alle aree bianche e gialle, e oltre al 60% per le aree rosse. Confrontando i valori ottenuti attraverso questo studio con i risultati degli esperimenti di rilascio condotti in soluzione, è emerso che la percentuale di Ag rilasciata *in vivo* sembra essere molto più elevata di quella stimata con gli studi di rilascio in soluzione. Questo incremento potrebbe essere attribuito all'assorbimento attivo delle AgNPs da parte delle cellule e alla continua produzione/eliminazione degli essudati. Quest'ultimo fenomeno favorisce il complessamento dell'Ag da parte delle proteine presenti nel liquido e la successiva traslocazione dell'Ag nel sistema circolatorio. La relazione tra la quantità di Ag rilasciata nel paziente e la gravità della ferita sottolinea il ruolo chiave che gli essudati rivestono. Osservando il grafico in figura 11 in cui sono indicate le percentuali di Ag rilasciato nelle diverse tipologie di ferita (riportate in ordine crescente di gravità da sinistra verso destra), si può vedere come la presenza degli essudati, più abbondanti nelle lesioni importanti, favorisca il rilascio di Ag nel paziente. Le barre di errore evidenziano come il rilascio di Ag sia molto variabile, sia che si considerino i campioni provenienti dallo stesso paziente sia confrontando pazienti diversi. I fattori che possono influenzare l'entità del rilascio sono molteplici: lo stato generale del tessuto, l'estensione e la gravità della ferita, che a loro volta influenzano l'andamento del processo di guarigione, i trattamenti farmacologici adottati e le

condizioni globali del paziente. Lo studio qui condotto ha permesso di stimare la quantità di Ag rilasciata nel paziente senza però darci informazioni in merito all'assorbimento e al destino delle AgNPs. La determinazione della quantità di Ag presente in alcune biopsie cutanee prelevate da un paziente ustionato trattato con Acticoat™ Flex3 per 7 giorni (capitolo 7) ha dimostrato che in questo arco di tempo si è accumulata nel tessuto (7mm di profondità) una concentrazione di Ag compresa tra 1.4 e 1.8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

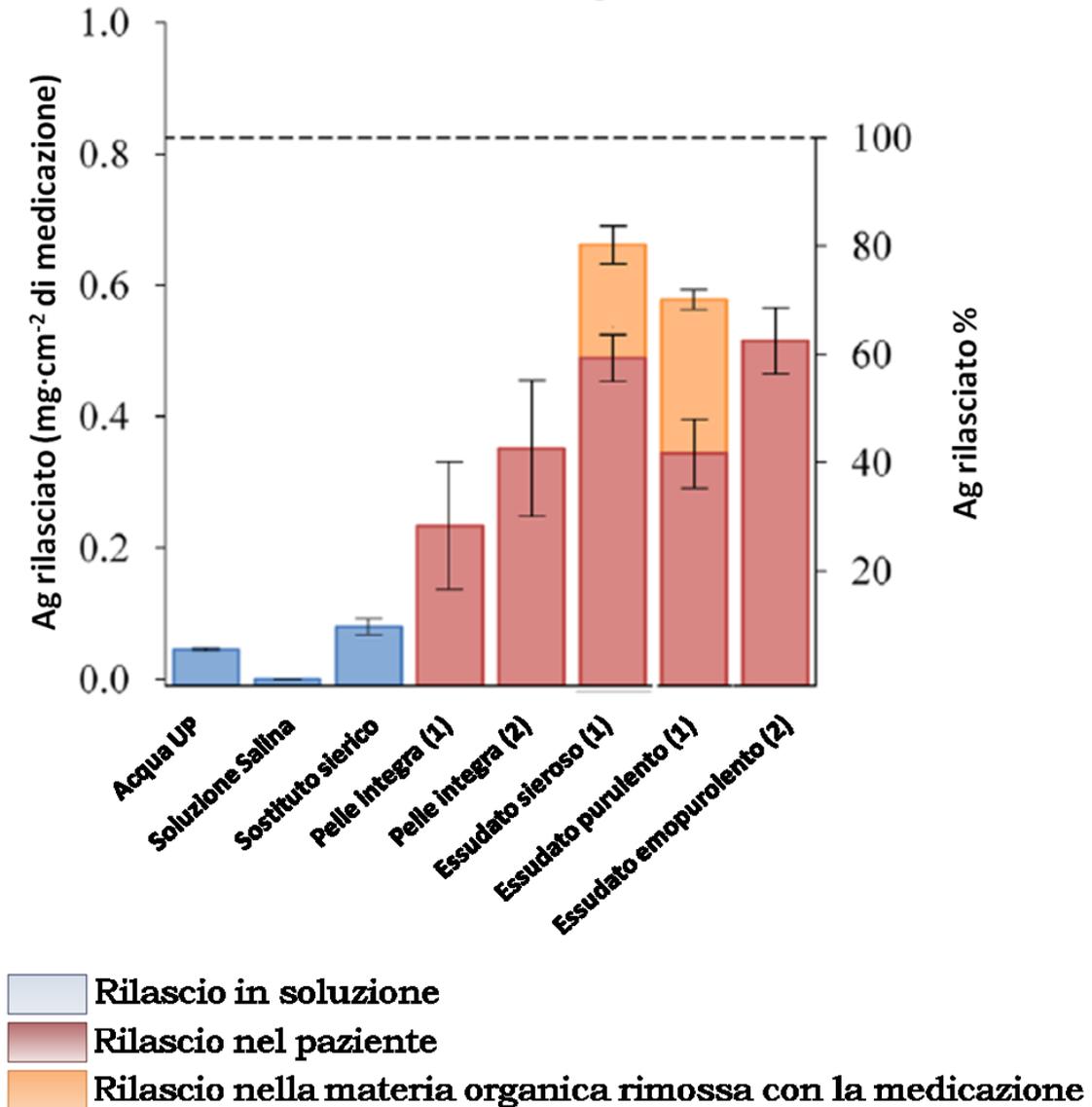


Figura 11: Rilascio di Ag *in vivo* da parte dell' Acticoat™ Flex3 dopo tre giorni di trattamento. Le medicazioni sono state applicate su due pazienti che presentavano ustioni profonde. Le concentrazioni e le percentuali riportate si riferiscono alla superficie di pelle trattata e coperta dalla medicazione. I dati sono corretti per la quantità di Ag rilasciato dalla medicazione nuova in TMAH (si veda il testo). Le barre di errore rappresentano la deviazione standard ottenuta dall'analisi di 3 replicati (n=3). I numeri tra parentesi indicano il paziente da cui è stata prelevata la medicazione. I dati di rilascio di Ag in soluzione discussi nel capitolo 4 sono riportati per confronto.

Questo valore rappresenta non più dello 0.5% dell'Ag che è stato stimato essere rilasciato dalla medicazione *in vivo*. Questo suggerisce che solo una minima parte dell'Ag rilasciato si accumula nella pelle. E' evidente che ulteriori studi sono necessari per completare il bilancio di massa dell'Ag. In particolare devono essere presi in considerazione la quantità di Ag trasferita nel sistema circolatorio e accumulata negli organi interni, insieme alla quantità di Ag che rimane intrappolata negli essudati e che con essi viene rimossa durante il cambio delle garze di cotone che generalmente sono applicate sopra la medicazione o durante la pulizia routinaria della ferita. Attraverso questo studio pilota è stato possibile dimostrare come sia praticamente impossibile simulare in modo realistico *in vitro* le condizioni che si verificano *in vivo*. Un maggiore sforzo dovrebbe essere fatto in particolare nello sviluppo di metodi che possono essere utilizzati per l'analisi dei campioni prelevati dopo il reale utilizzo *in vivo*, in quanto questi possono fornire un maggior numero di informazioni e dati più realistici rispetto a quelli ottenuti attraverso simulazioni.

5.3 CONCLUSIONI

I risultati degli esperimenti condotti in questa parte del lavoro indicano che per tutte le medicazioni (eccetto il Mepilex® Ag) i rilasci maggiori sono stati osservati nel sostituto sierico mentre i rilasci minori sono stati osservati in soluzione salina, a causa della formazione di AgCl che è stato rimosso in seguito alla centrifugazione del campione. La successiva risolubilizzazione e analisi del precipitato ha dimostrato che in realtà era stata rilasciata una quantità maggiore di Ag nel corso dell'esperimento ma che l'Ag rilasciato è immediatamente precipitato inattivando il principio attivo. Si ritiene, inoltre, che la maggior parte dell'Ag misurato nel sostituto sierico sia legato alle proteine presenti nella soluzione e che questo consenta all'Ag di restare solubile nonostante l'elevata concentrazione di Cl⁻. E' probabile che questo legame sposti l'equilibrio di rilascio rimuovendo Ag⁺ dalla soluzione e determinando così un rilascio più rapido dell'Ag dalla superficie. Infine, sebbene gli esperimenti di rilascio siano stati condotti per il tempo massimo di applicazione di ogni medicazione riportato sul foglietto illustrativo, al termine dell'esperimento solo una minima parte dell'Ag presente era stata rilasciata dai prodotti in soluzione. La maggior parte dell'Ag, infatti, si trova ancora attaccata al polimero, fatta eccezione per il caso del Mepilex® Ag. In questo lavoro è stato possibile dimostrare che l'Aquacel® Ag e l'Actisorb® Silver220 continuano a rilasciare una forma solubile dell'Ag anche al termine del tempo massimo di applicazione suggerito, mentre tutto l'Ag presente nel Mepilex® Ag viene rilasciato nell'arco di pochi minuti. I risultati ottenuti

in vitro sembrano indicare che il Mepilex® Ag dovrebbe essere utilizzato quando è necessario un rilascio estremamente veloce mentre l'Aquacel® Ag e l'Actisorb® Silver220, essendo caratterizzati da un rilascio più lento e più controllato, potrebbero forse essere lasciati sul paziente per un tempo più lungo rispetto a quello indicato dal produttore. E' da sottolineare comunque che la frequenza con cui una medicazione deve essere cambiata può essere valutata solo da parte di un medico specialista che conosce molto bene le ustioni, la loro evoluzione e le possibili complicazioni, al fine di minimizzare il rischio di infezioni. Ovviamente un rilascio più lento e prolungato risulta molto utile nella pratica clinica in quanto riduce il numero e la frequenza dei cambi della medicazione, che possono risultare molto dolorosi nel caso di ustioni estese. La dimostrazione che le medicazioni continuano a rilasciare Ag oltre il tempo indicato dal produttore, implica che la medicazione è ancora attiva e può essere lasciata in sede per un periodo di tempo più lungo se le condizioni locali lo consentono. Nella seconda parte del lavoro è stato condotto uno studio pilota sulla medicazione Acticoat™ Flex3 per confrontare i rilasci ottenuti in soluzione con i rilasci osservati indirettamente *in vivo*. Il rilascio *in vivo* è stato stimato indirettamente attraverso la determinazione della concentrazione di Ag ancora presente nelle medicazioni dopo il loro utilizzo su pazienti con ustioni profonde. Dalle analisi è emerso che *in vivo* viene rilasciato nel paziente una quantità di Ag compresa tra il 30% e il 60% dell'Ag presente nella medicazione prima del suo utilizzo. Mentre un quantitativo compreso tra il 10% e il 40% viene rilasciato nella materia organica e rimosso insieme alla medicazione. Dal confronto è emerso che i valori trovati *in vivo* sono maggiori rispetto a quelli ottenuti in soluzione. I rilasci stimati indirettamente *in vivo* risultano però maggiori anche di quelli stimati attraverso la determinazione della concentrazione di Ag nelle biopsie cutanee prelevate dai pazienti trattati con Acticoat™ Flex3 (si veda capitolo 7), indicando così che solo una minima parte dell'Ag rilasciato si accumula *in situ*. Una correlazione positiva è stata, inoltre, riscontrata tra la quantità di Ag rilasciata e la gravità della ferita, confermando il ruolo fondamentale che rivestono gli essudati nel trasporto dell'Ag all'interno dei tessuti lesionati.

Capitolo 6

Nel corso del progetto di ricerca è stato deciso di focalizzare lo sforzo scientifico nello studio della medicazione Acticoat™ Flex3. Tale scelta è stata determinata principalmente da due fattori: il primo è che tra tutte le medicazioni utilizzate presso il Centro Ustioni di Padova, l'Acticoat™ Flex3 rappresenta quella in assoluto più utilizzata. Ne consegue che l'interesse per la sicurezza e per il destino dell'Ag rilasciato da questa specifica medicazione era maggiore. Inoltre, scegliendo questa medicazione, è stato possibile reperire un numero di campioni e dati clinici più consistente rispetto a quello ottenibile durante lo studio di prodotti meno utilizzati. Infine, tra tutte le medicazioni studiate, l'Acticoat™ Flex3 è l'unica che è stata dimostrata contenere AgNPs. Considerato l'utilizzo diffuso che viene fatto attualmente di questi prodotti nanostrutturati e il grande interesse scientifico e commerciale che queste particelle rivestono, l'Acticoat™ Flex3 si presentava come un buon prodotto modello per la valutazione del comportamento chimico, della sicurezza e biocompatibilità delle AgNPs.

Recentemente è stato dimostrato che le AgNPs sono caratterizzate da particolari e non comuni proprietà fisiche, chimiche e biologiche [52, 214, 215]. L'efficacia antimicrobica delle AgNPs è stata ampiamente dimostrata *in vitro*, e molti lavori pubblicati in letteratura dimostrano che le medicazioni contenenti AgNPs hanno un'attività antibatterica veloce e ad ampio spettro contro i batteri sia Gram positivi che Gram negativi [216, 217]. Purtroppo ad oggi gli studi condotti *in vivo* sono molto limitati [192, 218]. Sebbene le medicazioni contenenti AgNPs siano considerate sicure per i pazienti e non citotossiche [14, 43, 213], studi recenti hanno evidenziato possibili effetti negativi su cheratinociti e fibroblasti [219, 220]. Gli effetti citotossici osservati in diverse linee cellulari includono la riduzione dell'attività mitocondriale [221], contrazione delle cellule e alterazioni della morfologia cellulare [222] e produzione di ROS [47, 48]. Carlson e collaboratori [49] hanno dimostrato in particolare che la produzione di ROS è correlata alla dimensione e alla concentrazione delle particelle, mentre Hackenberg e colleghi [223] hanno dimostrato che le AgNPs sono in grado di danneggiare il DNA delle cellule staminali mesenchimali. Tenendo in considerazione le ben riconosciute proprietà antibatteriche delle AgNPs e il grande interesse nella loro applicazione sia come rivestimento di dispositivi medici e sia nel trattamento delle ferite, è necessario studiare e chiarire con urgenza la biocompatibilità di questi prodotti nanostrutturati e la sicurezza nel loro utilizzo. In questa parte del lavoro di ricerca sono presentati i risultati ottenuti durante lo studio pilota

della citotossicità indotta dalla medicazione Acticoat™ Flex3 in colture cellulari tridimensionali di fibroblasti umani [224, 225]. La scelta di utilizzare colture cellulari tridimensionali è stata determinata dalla necessità di costruire un sistema in grado di simulare nel modo più simile possibile la struttura del derma. Di recente sono stati condotti *in vitro* delle ricerche per valutare la sicurezza dell'Acticoat™ Flex3 nei confronti di cellule umane derivate dalla cute [226, 227]. I risultati ottenuti nei lavori citati sono però in contrasto con gli studi condotti *in vivo* [228, 229] e con l'osservazione quotidiana dei pazienti trattati con la medicazione [230]. Parallelamente è stato studiato il rilascio di Ag all'interno del sistema medicazione/coltura cellulare/mezzo di coltura. In questo lavoro l'Acticoat™ Flex3 è stato applicato sulle colture cellulari tridimensionali e sostituito ogni tre giorni per simulare il cambio di medicazione effettuato dai medici presso il Centro Ustioni. La concentrazione di Ag rilasciata nel mezzo di coltura e quella ancora presente nelle medicazioni dopo il loro utilizzo è stata determinata attraverso analisi ICP-MS, mentre la concentrazione di Ag assorbita dalle cellule è stata valutata per differenza. E' stato, inoltre, possibile utilizzare materiali di scarto provenienti da altri esperimenti per valutare la localizzazione dell'Ag all'interno della coltura cellulare.

Tecniche biochimiche e morfologiche sono state impiegate per studiare la vitalità e la distribuzione spaziale delle cellule durante l'applicazione dell'Acticoat™ Flex3. I risultati dimostrano che le AgNPs alterano la funzionalità mitocondriale nei fibroblasti umani, senza però causare la morte della cellula. Nonostante la ridotta attività metabolica, infatti, le cellule erano vive e non presentavano segni di apoptosi o di necrosi. E' probabile che la citotossicità apparente osservata da altri autori sia un artefatto legato all'utilizzo di un test sviluppato per stimare della vitalità mitocondriale e che rappresenta una via indiretta per valutare la vitalità cellulare. Questo studio pilota è stato condotto su un limitato numero di campioni e di replicati, e le conclusioni tratte hanno valore locale e necessitano di essere verificate e approfondite in futuro.

6.1 ALLESTIMENTO DELLE COLTURE CELLULARI

I fibroblasti isolati dal derma umano sono stati preparati utilizzando una versione modificata del protocollo sviluppato da Rheinwald e Green [231]. Dopo la rimozione enzimatica dell'epidermide, il derma è stato tagliato in piccoli pezzi (2-3 mm²). I fibroblasti sono stati isolati attraverso una digestione sequenziale con una soluzione di tripsina 0.25% m/v per 20 minuti e successivamente con una soluzione di collagenasi 0.25% m/v per 4 ore. Le cellule sono state poi poste in coltura all'interno del mezzo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium,

Lonza S.r.l., Milano, Italia) addizionato con del SFB (Siero Fetale Bovino, Bidachem S.p.A., Milano, Italia) 10%, penicilina 100 unità/mL e streptomina 100 µg/mL. Il mezzo di coltura risultante è chiamato DMEM completo (cDMEM). Il mezzo è stato sostituito due volte a settimana, e le cellule sono state staccate dal fondo della piastra in cui erano cresciute attraverso un trattamento con tripsina. Le cellule raccolte sono state poi seminate con una densità di 1.2×10^5 cells·cm⁻² su un sostituto dermico chiamato MatriDerm® (Dr. Suwelack Skin & Health Care AG, Billerbeck, Germania), il cui scopo era fornire un'impalcatura biocompatibile in cui le cellule potessero crescere e proliferare. Nel corso dei successivi 10 giorni, le cellule hanno colonizzato la medicazione sostitutiva a base di collagene immersa in 800 µL di cDMEM e hanno dato così origine a un tessuto tridimensionale simile al derma. La densità a cui seminare le cellule è stata scelta sulla base di precedenti studi condotti da Zavan e collaboratori [224, 225]. I pezzi di Acticoat™ Flex3 sono stati, quindi, applicati sopra le colture cellulari. Al fine di garantire e incrementare la riproducibilità, tutti gli esperimenti sono stati condotti utilizzando sottocampioni prelevati dal medesimo pezzo di Acticoat™ Flex3 e di MatriDerm®. Anche in questo caso, il sostituto dermico e la medicazione sono stati tagliati utilizzando dei *punch* per biopsie cutanee in modo che i campioni avessero tutti la stessa area superficiale. Sono stati prelevati 40 sottocampioni di Acticoat™ Flex3 utilizzando un *punch* con un diametro interno di 6 mm, mentre 15 pezzi di MatriDerm® sono stati ottenuti con l'uso di un *punch* leggermente più grande (diametro interno di 8 mm). Ogni tre giorni il pezzo di medicazione applicato sulle colture è stato rimosso e sostituito con un nuovo pezzo. Contemporaneamente, è stato prelevato il terreno di coltura e sostituito con mezzo fresco. In questa serie di esperimenti è stato creato un set di 9 colture cellulari 3D che sono servite da controllo, e 9 colture cellulari che sono state utilizzate come "trattato". Ogni 3 giorni, quindi al giorno 3, 6, e 9 dall'inizio dell'esperimento è stata sacrificata una coltura cellulare di controllo e una coltura trattata per effettuare il test di funzionalità mitocondriale MTT (si veda sezione 6.2). Negli stessi intervalli di tempo, altre due colture cellulari di controllo e due trattate sono state destinate alle analisi istologiche finalizzate allo studio della distribuzione cellulare all'interno del MatriDerm®. Il mezzo di coltura rimosso e i pezzi di Acticoat™ Flex3 utilizzati nel corso dell'esperimento sono stati raccolti e la concentrazione di Ag è stata determinata mediante analisi ICP-MS, come riportato nel paragrafo 6.4.

6.2 TEST MTT

6.2.1 PARTE SPERIMENTALE

Per determinare le cinetiche di crescita cellulare in presenza o meno di AgNPs è stato condotto il saggio di citotossicità MTT, utilizzando il metodo proposto da Denizot e Lang [232] con modifiche limitate. Questo saggio colorimetrico prevede l'utilizzo del composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) e rappresenta un metodo indiretto per valutare la crescita e la proliferazione cellulare. Il composto in soluzione acquosa è caratterizzato dal colore giallo ed è in grado di attraversare le membrane cellulari. Una volta entrato nella cellula viene ridotto dalle deidrogenasi o dagli agenti riducenti presenti nelle cellule metabolicamente attive, trasformandosi in una molecola insolubile, viola e chiamata formazano. Il formazano viene quindi estratto dalle cellule utilizzando solventi organici e quantificato per via spettrofotometrica. La quantità di formazano prodotto è direttamente proporzionale all'attività metabolica delle cellule. Una volta rimosso il mezzo di coltura le cellule sono state incubate per 3 ore a 37°C in una soluzione di MTT 0.5 mg·mL⁻¹ preparata in PBS (soluzione salina di tampone fosfato). La soluzione di MTT è stata, quindi, rimossa mediante pipetta e conservata al fine di determinare la concentrazione di Ag mediante analisi ICP-MS (vedi sezione 6.4). Questa soluzione verrà chiamata da qui in poi frazione MTT. Una volta rimossa la soluzione di MTT, sono stati aggiunti alle colture cellulari 0.5 mL di DMSO (dimetilsolfossido) al 10% in isopropanolo (chiamato da qui in poi iDMSO). L'iDMSO è stato tenuto a contatto con le cellule per 30 minuti a 37° C per indurre la lisi cellulare ed estrarre il formazano. Per ogni campione, sono stati misurati i valori di assorbanza a 570 nm: l'assorbanza è stata determinata su due separate aliquote di ogni campione, ognuna con volume pari a 200 µL. Le aliquote sono state depositate in una piastra multipozzetto e lette attraverso uno spettrofotometro Victor 3 (Perkin Elmer, Milano, Italia). La funzionalità mitocondriale nelle colture cellulari poste a contatto con le AgNPs è stata determinata come il rapporto tra l'assorbanza a 570 nm del campione trattato rispetto all'assorbanza del campione controllo, ed espressa come percentuale. Al termine delle letture, le aliquote di iDMSO sono state recuperate e successivamente analizzate mediante ICP-MS per determinare la concentrazione di Ag in questa frazione (frazione iDMSO, si veda sezione 6.4).

6.2.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti riportati in figura 12 dimostrano che l'attività mitocondriale diminuisce rapidamente durante i primi tre giorni di trattamento. Dopo 3 giorni di esposizione alle AgNPs l'attività mitocondriale delle cellule trattate era pari solo al $17 \pm 0.54\%$ di quella misurata nei campioni di controllo. Dopo 6 giorni di trattamento l'attività mitocondriale relativa nei trattati era ulteriormente scesa fino a raggiungere un valore del $7 \pm 0.01\%$. Nei successivi tre giorni, l'attività mitocondriale nei campioni trattati era crollata al $5 \pm 0.03\%$ di quella misurata nei campioni non trattati. Questo indica che la AgNPs e Ag^+ alterano pesantemente la funzionalità mitocondriale, e questo è probabilmente collegato con la produzione di ROS, in accordo con i risultati ottenuti da AshaRani [222] e Hsin[48].

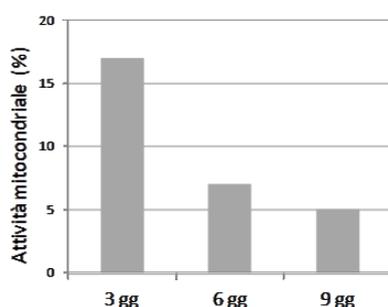


Figura 12: Attività mitocondriale nelle colture cellulari tridimensionali di fibroblasti umani trattati con AgNPs. L'attività mitocondriale dei campioni trattati è espressa come la percentuale di attività nei campioni di controllo. In ogni punto temporale, i valori di attività mitocondriale sono ottenuti dalla lettura di due aliquote provenienti dallo stesso campione.

6.3 ANALISI MORFOLOGICHE

6.3.1 PARTE SPERIMENTALE

Contestualmente al saggio MTT sono state condotte delle analisi morfologiche in duplicato sui campioni di controllo e sui trattati. Dopo la rimozione del mezzo di coltura e dell'Acticoat™ Flex 3, le colture cellulari tridimensionali sono state prelevate e incluse nella resina OCT (*Optimal Cutting Temperature*), un prodotto comunemente utilizzato nella preparazione dei campioni prima del taglio al criomicrotomo. La resina è stata solidificata in azoto liquido e i campioni inclusi sono stati conservati a -80°C fino al momento del taglio. Ogni campione è stato, quindi, tagliato in sezioni sottili (spessore maggiore di $7 \mu\text{m}$) longitudinali utilizzando un criomicrotomo (CM1950, Leica, Milano, Italia). La direzione del taglio ha consentito di studiare la distribuzione delle cellule all'interno del MatriDerm® in particolare lungo lo spessore del

sostituto dermico. Le sezioni sono state depositate su vetrini da microscopia ricoperti con gelatina, e fissate con acetone assoluto per 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni risultanti sono stati conservati a -20°C fino al momento del loro utilizzo. Per poter studiare la distribuzione delle cellule all'interno del MatriDerm® e per poter visualizzare la presenza di frammentazione nucleare, i nuclei dei fibroblasti sono stati colorati con il fluoroforo Hoechst H33342 (Sigma Aldrich, Milano, Italia, concentrazione finale utilizzata $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Il colorante Hoechst è in grado di colorare selettivamente i nuclei in blu e viene utilizzato per verificare l'integrità nucleare o la presenza di indici apoptotici, quali la condensazione della cromatina e la formazione di corpi apoptotici. I campioni colorati sono stati osservati con un microscopio a fluorescenza Zeiss Axioplan alla lunghezza d'onda di 461 nm, dotato di fotocamera digitale per l'acquisizione delle immagini (DC500, Leica, Milano, Italia).

6.3.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati sono riportati in figura 13. La figura 13a rappresenta il campione controllo dopo tre giorni dall'inizio dell'esperimento

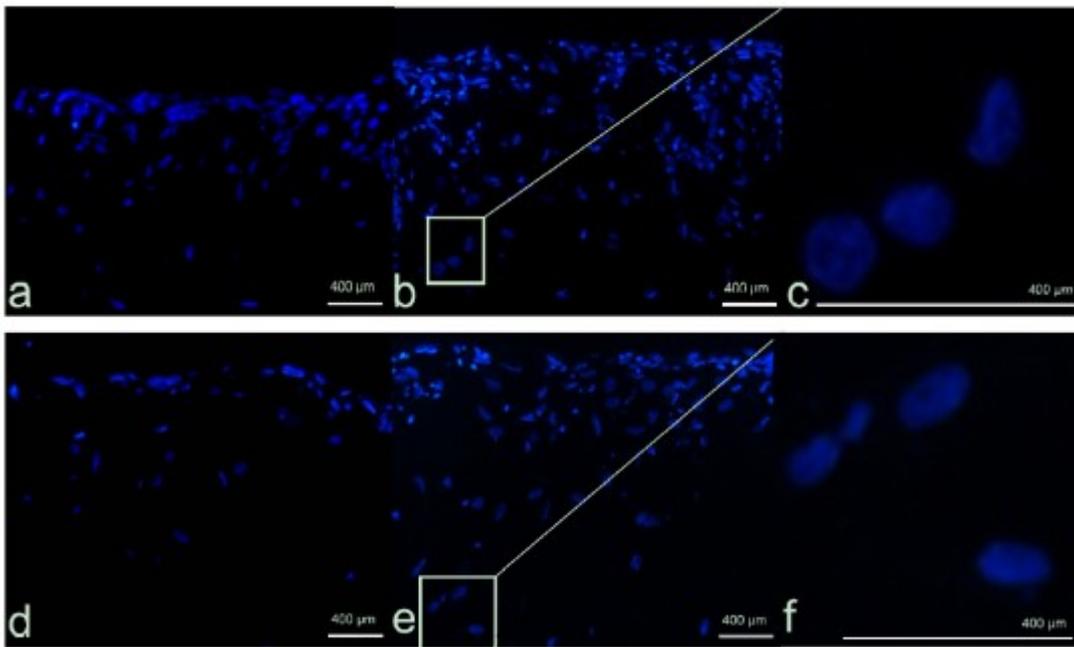


Figura 13: Ricostruzione in vitro di un tessuto simile al derma. Le cellule, visibili grazie alla colorazione del nucleo mediante il colorante blu Hoechst H33342, si trovano all'interno del MatriDerm® e sono organizzate in strati. a) campione di controllo (non trattato) dopo 3 giorni dall'inizio dell'esperimento. b) campione di controllo al termine dell'esperimento (9 giorni). c) ingrandimento dell'area selezionata. d) fibroblasti trattati con AgNPs dopo 3 giorni dall'inizio dell'esperimento. e) campione trattato con AgNPs al termine dell'esperimento (9 giorni). f) ingrandimento dell'area selezionata.

In questa immagine è possibile osservare come i fibroblasti crescano prevalentemente sulla superficie del MatriDerm®, anche se alcune cellule sono presenti all'interno dell'impalcatura proteica. Il sistema di coltura cellulare qui utilizzato appare, quindi, come un sistema multistrato che assomiglia al derma, e all'interno del quale le cellule possono crescere e proliferare durante l'esperimento (figura 13b). Nel campione controllo non sono presenti segni di apoptosi (figura 13c). Una distribuzione simile delle cellule è stata osservata anche nei campioni trattati con AgNPs (figura 13d). È interessante notare come nonostante la ridotta attività mitocondriale osservata con il saggio MTT, i nuclei siano ancora presenti e appaiano non danneggiati. Non sono stati osservati corpi apoptotici o frammentazione nucleare (figure 13e e 13f). I risultati qui riportati sono in accordo con quelli ottenuti da Zanette e collaboratori [220] sulle cellule HaCaT, e supportano l'ipotesi che le AgNPs riducano l'attività mitocondriale senza però causare genotossicità e morte cellulare.

6.4 RILASCIO E VALUTAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE DELL' Ag MEDIANTE ICP-MS

6.4.1 PARTE SPERIMENTALE

In tutti i campioni (terreno di coltura, medicazioni, estratti cellulari) la concentrazione di Ag è stata determinata mediante analisi ICP-MS utilizzando uno strumento 7500cx Agilent Technologies (Tokio, Giappone). I principali parametri strumentali sono riportati in tabella 9

Potenza generatore di radiofrequenza	1500W
Flusso del plasma gas	15 L·min ⁻¹
Flusso del gas di trasporto	1.2 L·min ⁻¹
Nebulizzatore	V-groove
Impostazioni lenti ioniche	Ottimizzate giornalmente per ottenere il massimo della sensibilità usando una soluzione 10 ng·g ⁻¹ di Ag in NH ₄ OH 2.8% m/m
Masse monitorate	107, 109
Punti per picco	3
Tempo di acquisizione per massa	1s
Replicati	5

Tabella 9: condizioni operative della strumentazione ICP-MS durante le analisi per la quantificazione dell'Ag nei diversi campioni.

I pezzi di Acticoat™ Flex3 prima e dopo la loro applicazione sulle colture cellulari sono stati mineralizzati utilizzando il metodo in sistema chiuso messo a punto e descritto nel capitolo 4. Brevemente, i pezzi di medicazione (circa 2 mg) sono stati posti all'interno di contenitori in

Teflon, addizionati con 10 mL di HNO_3 , e mineralizzati in forno a microonde Ethos1 (Milestone, Sorisole, Italia) per 50 minuti a 200°C . I contenitori sono stati poi fatti raffreddare a temperatura ambiente e aperti per consentire l'aggiunta di 2 mL di H_2O_2 al 30% m/m. La seconda fase della mineralizzazione è stata condotta a 200°C per 10 min. La digestione dei pezzi di Acticoat™ Flex3 dopo l'utilizzo sulle colture cellulari ha dato origine ad un disgregato torbido contenente del materiale in sospensione. Il materiale sospeso, probabilmente AgCl formatosi a causa della presenza di Cl^- nel cDMEM; è stato rimosso mediante centrifugazione (3000 rpm per 10 minuti). Il surnatante è stato rimosso con la pipetta e diluito in NH_4OH 2.8% m/m prima dell'analisi ICP-MS. Il precipitato, invece, è stato ridissolto in 1.5 mL di NH_4OH concentrato (28% m/m), e successivamente diluito in NH_4OH 2.8% m/m prima delle analisi.

La concentrazione di Ag è stata quantificata anche nel terreno di coltura proveniente sia dai campioni trattati che dai campioni controllo. I campioni di terreno (400 μL di cDMEM) sono stati diluiti direttamente in NH_4OH 2.8% m/m, TMAH 0.1% m/m e Triton-X 0.1% v/m e, quindi, analizzati per determinare la concentrazione totale di Ag mediante ICP-MS.

La concentrazione di Ag nelle colture cellulari (e nel MatriDerm®) è stata stimata indirettamente come la differenza tra la quantità di Ag presente nel pezzo di medicazione prima del suo utilizzo e la somma della concentrazione di Ag nel terreno di coltura e nella medicazione al termine dell'applicazione. Al fine di verificare l'accuratezza dei valori stimati per differenza, i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti mediante quantificazione diretta dell'Ag presente nelle colture cellulari (incluso il MatriDerm®) precedentemente utilizzate per il saggio MTT. La concentrazione di Ag nelle cellule e nel sostituto dermico su cui erano cresciute è stata determinata come somma della concentrazione misurata nella soluzione di MTT recuperata dopo l'incubazione, e nelle due aliquote di iDMSO riunificate dopo la lettura spettrofotometrica delle stesse. La frazione iDMSO è stata trattata con 1.5 mL di NH_4OH 28% m/m per solubilizzare ogni forma di Ag, incluse quelle attaccate a eventuali frammenti di MatriDerm®. Il campione è stato poi centrifugato a 3000 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato diluito fino al volume finale di 15 mL in TMAH 0.1% m/m and Triton-X 0.1% v/m. La frazione MTT è stata invece diluita (1+14) in NH_4OH 2.8% m/m, TMAH 0.1% m/m e Triton-X 0.1% v/m. Quest'ultima soluzione è stata infine utilizzata per diluire (200 volte) la frazione MTT e quella iDMSO subito prima delle analisi ICP-MS. È stato condotto, inoltre, un esperimento di controllo della durata di 3 giorni per quantificare come l'Ag si distribuisca tra le frazioni sopra descritte e il MatriDerm® in assenza di cellule. In questo esperimento, al termine dell'estrazione con iDMSO, sono stati aggiunti 500 μL di NH_4OH 28% m/m alla provetta

contenente la soluzione iDMSO e il sostituto dermico. Per garantire che tutto l'Ag attaccato alla superficie del MatriDerm® venisse rimosso, la provetta è stata agitata con forza per 1 minuto a temperatura ambiente. La soluzione è stata poi rimossa con la pipetta e il sostituto dermico è stato lavato con due aliquote separate (500 µL ciascuna) di NH₄OH 28% m/m, al fine di recuperare ogni forma di Ag legato alla superficie esterna del MatriDerm® e solubilizzare anche le specie insolubili dell'Ag presenti, quali ad esempio l'AgCl o l'Ag legato alle proteine insolubili come riportato nel capitolo 5. Tutte le frazioni raccolte sono state poi riunificate con la frazione iDMSO e analizzate mediante ICP-MS. Il rimanente MatriDerm® solido è stato, infine, mineralizzato con 500 µL di TMAH (25% m/m in acqua) ed analizzato mediante ICP-MS per quantificare l'Ag intrappolato nel sostituto dermico.

6.4.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

La concentrazione di Ag nella medicazione Acticoat™ Flex3 prima del suo utilizzo è pari a $821 \pm 20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ in accordo con i valori misurati nelle medicazioni analizzate nei capitoli 4 e 5. Questo risultato dimostra che la variabilità di concentrazione tra i diversi lotti di produzione dell' Acticoat™ Flex3 è trascurabile. In tabella 10 sono riportati i risultati della concentrazione di Ag. E' stato scelto di riportare i dati di concentrazione come µg di Ag per cm² (µg·cm⁻²) di coltura cellulare coperta con il pezzo di Acticoat™ Flex3. I dati sono riportati per singola applicazione. Durante il corso dell'esperimento di rilascio sono state effettuate tre applicazioni consecutive di medicazione contenente AgNPs: al momento della seconda e della terza applicazione, i pezzi di Acticoat™ Flex3 presenti sulle colture cellulari sono stati rimossi e sostituiti con pezzi nuovi con identica area superficiale e provenienti dalla stessa medicazione originale. Contestualmente il mezzo di coltura (cDMEM) è stato rimosso e sostituito con un identico volume di terreno fresco. La quantità di Ag applicata alle colture cellulari in ogni fase dell'esperimento è stata calcolata basandosi sulla media delle concentrazioni di Ag presente nei pezzi di Acticoat™ Flex3 prima del loro utilizzo, tenendo in considerazione che tutti i pezzi utilizzati avevano la stessa area superficiale (0.283 cm², diametro 6 mm). La frazione di Ag corrispondente alla medicazione utilizzata (chiamato Medicazione in tabella 10) è costituita dall'Ag che non è mai stato rilasciato dalla medicazione e dall'Ag che è stato rilasciato ma che ha aderito di nuovo all'Acticoat™ Flex3 in altra forma, come ad esempio sottoforma di piccoli frammenti di MatriDerm® contenenti Ag che restano attaccati alla superficie della medicazione rimossa.

Giorni	Numero campioni	Ag ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)			
		Ag applicato	Medicazione	Terreno	Coltura
1-3	n = 9	821	767 \pm 4	37 \pm 5	18 \pm 3
3-6	n = 6	821	765 \pm 3	31 \pm 3	25 \pm 2
6-9	n = 3	821	765 \pm 4	32 \pm 2	25 \pm 3

Tabella 10: Risultati delle tre applicazioni consecutive di Ag alle colture tridimensionali di fibroblasti umani. I risultati sono espressi come μg di Ag per cm^2 ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) di coltura coperta dalla medicazione. Sulla base dell'analisi della medicazione prima del suo utilizzo, la quantità di Ag applicata viene considerata identica in tutte le fasi dell'esperimento. La concentrazione di Ag nella medicazione e nel terreno di coltura sono state quantificate mediante analisi ICP-MS. La concentrazione di Ag nelle colture tridimensionali è stata ottenuta per differenza e calcolata come media delle differenze.

La frazione Terreno rappresenta, invece, la quantità di Ag rilasciata nel mezzo di coltura liquido, mentre la frazione Coltura è stata calcolata per differenza e rappresenta la quantità di Ag che è stata trattenuta dalle colture cellulari tridimensionali. Durante ogni singola applicazione dell'Acticoat™ Flex3, la maggior parte dell'Ag (circa il 94%) rimane all'interno della medicazione. Questo risultato è in linea con quanto osservato durante gli esperimenti di rilascio in soluzione (capitolo 5): in questo caso, dopo 3 giorni dall'inizio dell'esperimento, la quantità di Ag ancora presente nella medicazione era compresa tra il 94% e il 99% a seconda della composizione della soluzione considerata. In questo studio la frazione che contiene la minore concentrazione di Ag è risultata essere la frazione Coltura. La concentrazione di Ag nelle colture cellulari, sebbene bassa, non è trascurabile: al termine dei 9 giorni di trattamento la concentrazione cumulativa nelle colture era pari a $68 \pm 7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 3$). A differenza del terreno di coltura e delle medicazioni che sono state sostituite ogni 3 giorni, le colture cellulari sono rimaste le stesse durante tutto il corso dell'esperimento. Nonostante le colture non siano state sostituite, la quantità di Ag assorbita dalle stesse è cresciuta da $18 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 9$), misurata nei primi 3 giorni dell'esperimento, a $25 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$) e $25 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 3$), misurate rispettivamente nella seconda e terza parte dell'esperimento. Dai risultati emerge una correlazione inversa tra l'attività mitocondriale misurata nelle cellule trattate con AgNPs e la quantità di Ag assorbita dalle stesse, suggerendo così una relazione causale diretta. La frazione di Ag rilasciata nel mezzo di coltura segue invece un andamento opposto: tra la prima e la seconda fase dell'esperimento, la quantità di Ag rilasciata nel terreno liquido diminuisce. Questo può essere spiegato se si considera che l'Acticoat™ Flex3 rilascia nel mezzo di coltura una quantità costante di Ag ma l'assorbimento da parte delle cellule aumenta durante la seconda e la terza parte del trattamento. Al fine di verificare che la concentrazione di Ag nelle

cellule stimata per differenza fosse corretta, è stato deciso di quantificare l'Ag presente nella frazione MTT e nella frazione iDMSO ottenute al termine del saggio di valutazione della funzionalità mitocondriale. In tabella 11 sono riportati i risultati della quantificazione diretta della concentrazione di Ag nelle due frazioni. La somma delle frazioni è riportata nella stessa tabella e confrontata con il valore di concentrazione cumulativa stimato per differenza. La quantificazione diretta dell'Ag nelle colture cellulari ha dato dei valori più bassi di quelli ottenuti con la stima indiretta, ovvero quelli derivati dal bilancio di massa del metallo. C'è da sottolineare che la quantificazione diretta è stata effettuata su un unico replicato e che per questo motivo non può essere data una stima dell'incertezza associata al valore. La sottostima della concentrazione di Ag è probabilmente dovuta a un recupero non quantitativo dell'elemento in seguito alle due estrazioni (la prima nel tampone contenente il composto MTT e la seconda con iDMSO).

Giorni	Stimata	MTT + iDMSO	MTT	iDMSO	TMAH
3	16.5	16.3	5.8	10.5	-
6	40.9	30.9	8.0	22.9	-
9	62.9	46.5	10.3	36.2	-
Esperimento di controllo in assenza di cellule n = 3 replicati ± 1 Deviazione Standard					
3	-	12.5 ± 5.1	8.9 ± 3.7	3.3 ± 1.8	0.7 ± 0.3

Tabella 11: Concentrazione cumulativa di Ag ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) in colture cellulari (n = 1) e nell'esperimento di controllo (n = 3). E' riportato, inoltre, il confronto tra i valori stimati per differenza e la somma delle misure dirette effettuate nelle frazioni MTT e iDMSO. TMAH: tetrametilammonio idrossido.

Si ritiene plausibile che al termine delle estrazioni una parte dell'Ag sia rimasta attaccata al MatriDerm®. Attraverso questo tentativo di quantificazione è stato dimostrato che la determinazione diretta e accurata della concentrazione di Ag nelle colture cellulari richiede l'utilizzo un replicato separato dell'esperimento. La stima indiretta rappresenta, però, un'alternativa attuabile per descrivere le cinetiche e la distribuzione dell'Ag all'interno del sistema. Allo stesso tempo la stima indiretta consente la riduzione sia del tempo che dei materiali necessari per l'esperimento. La frazione di Ag estratta all'interno della soluzione iDMSO è sempre maggiore di quella estratta con la soluzione di MTT, e la quantità di Ag estratta cresce quasi linearmente ($R^2 = 0.9996$) tra il terzo e nono giorno di trattamento (Figura 14).

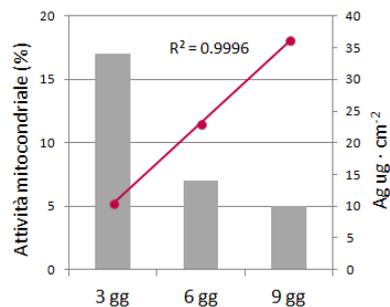


Figura 14: Confronto tra attività mitocondriale relativa nelle colture cellulari tridimensionali trattate con AgNPs per 9 giorni (asse y primario) e variazione della concentrazione di Ag nella frazione iDMSO (asse y secondario) espressa come μg di Ag per cm^2 ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) ottenuta dalle medesime colture cellulari in funzione del tempo. In figura viene riportato il valore di R^2 relativo alla variazione di concentrazione di Ag in funzione del tempo.

Nell'esperimento di controllo, la quantità di Ag misurata nella frazione MTT è il 70% di tutto l'Ag rilasciato. Questo valore è simile a quello misurato nella frazione MTT dopo 6 giorni di trattamento dei fibroblasti umani. Nell'esperimento di controllo la quantità di Ag misurata nella frazione iDMSO è il 25% dell'Ag rilasciato. Questo valore è molto inferiore a quello misurato nella medesima frazione quando erano presenti anche i fibroblasti. Infine, la quantità di Ag misurata in seguito alla dissoluzione del MatriDerm® è stata pari al 5% del totale. Questa ripartizione è facilmente spiegabile: secondo quanto dichiarato dal produttore, il MatriDerm® è un sostituto dermico composto da elastina e collagene di tipo I, III e V ottenuti da legamenti nucleari bovini. Le proteine che compongono il MatriDerm® hanno un numero limitato di cisteine. Per questo motivo l'Ag si lega debolmente alla struttura proteica ed è facilmente estraibile già durante la prima estrazione (frazione MTT). La concentrazione di Ag nella frazione MTT dovrebbe quindi rappresentare la quantità di Ag legata debolmente al MatriDerm® o alla superficie esterna delle membrane cellulari. E' noto che l'Ag interagisce fortemente con il DMSO [233] e che questo composto organico causa la lisi cellulare. Si può pertanto ragionevolmente ritenere che la concentrazione di Ag misurata nella frazione iDMSO rappresenta la maggior parte dell'Ag che si trovava all'interno della cellula o legato ai costituenti cellulari attraverso interazioni forti. Questa ipotesi è confermata dall'esperimento di controllo: è stato dimostrato, infatti, che la quantità di Ag estratta dal MatriDerm® con la soluzione iDMSO è sempre inferiore a quella ottenuta in presenza di cellule, e che la completa dissoluzione del sostituto dermico determina il rilascio solo del 5% di tutto l'Ag presente. Questo dimostra che durante i 9 giorni di trattamento la maggior parte dell'Ag viene assorbito dalle cellule o si trova legato fortemente alla loro superficie. Considerando che la

concentrazione di Ag nella frazione iDMSO cresce linearmente durante il corso dell'esperimento, è possibile concludere che le cellule continuano ad assorbire l'Ag e che i siti di interazione presenti all'interno e sulla superficie esterna delle cellule non sono stati saturati.

6.5 CONCLUSIONI

In questo studio pilota, i risultati ottenuti *in vitro* sulle colture cellulari tridimensionali sembrano indicare la sicurezza e biocompatibilità della medicazione Acticoat™ Flex3. Sebbene sia stato dimostrato che le AgNPs sono in grado di ridurre la funzionalità mitocondriale, questo fenomeno sembra essere provvisorio e limitato nel tempo (vedi anche capitolo 7). I risultati delle indagini morfologiche condotte sui replicati dei campioni hanno evidenziato, infatti, che nonostante la ridotta attività mitocondriale, i fibroblasti sono vivi e non presentano segni di apoptosi. Per la prima volta è stato possibile utilizzare materiali di scarto provenienti da altre indagini per valutare la distribuzione dell'Ag all'interno di un sistema di coltura cellulare tridimensionale. In particolare, è stato possibile discriminare la quantità di Ag che si trovava legata debolmente alla superficie esterna delle cellule e al sostituto dermico, dalla quantità di Ag che si trovava dentro i fibroblasti o legata fortemente ai costituenti cellulari. C'è da sottolineare nuovamente che questa parte del lavoro è stata condotta su un numero esiguo di campioni e di replicati e che, quindi, i risultati ottenuti hanno valore locale e necessitano di essere confermati da ulteriori esperimenti. In particolare l'attività mitocondriale è stata monitorata soltanto per 9 giorni, e non è ancora stato possibile dimostrare l'effettivo recupero della funzionalità mitocondriale suggerito dalle osservazioni effettuate sulle biopsie cutanee prelevate da pazienti ustionati (si veda capitolo 7).

Capitolo 7

Sebbene le colture cellulari rappresentino un valido strumento per lo studio della citotossicità e della biocompatibilità delle AgNPs, l'utilizzo di cellule in coltura presenta notevoli limiti rispetto all'utilizzo di modelli animali. Il lavoro di Murphy [234] illustra molto bene i vantaggi e gli svantaggi dell'utilizzo delle colture cellulari rispetto agli organismi interi. Il primo limite descritto sottolinea come negli animali ci siano molteplici fattori, originati da cellule e tessuti diversi, che interagiscono insieme nel dare la risposta fisiologica osservata durante uno studio. L'utilizzo delle colture cellulari non consente lo studio di questa interazione. Inoltre, è possibile che sostanze che provocano reazioni e risposte quando somministrate ad un animale, non diano effetti osservabili se utilizzate su colture cellulari o su tessuti isolati. Infine, nell'animale sono presenti molti meccanismi che agiscono per regolare i processi fisiologici, sia inibendoli, sia stimolandoli. L'uso delle colture cellulari consente, invece, di studiare un solo meccanismo per volta, mentre è impossibile studiare tutte le interazioni che avvengono in condizioni fisiologiche. Nel caso specifico dello studio della tossicità indotta dalle AgNPs in colture cellulari tridimensionali di fibroblasti umani, è necessario sottolineare che in questo modello non è stato possibile replicare e studiare l'effetto che gli essudati e il circolo sanguigno hanno sulla rimozione dell'Ag rilasciato dalla medicazione quando questa è applicata su una ferita aperta. Grazie alla collaborazione con il Centro Ustioni con l'Unità Operativa Complessa di Chirurgia Plastica Clinica di Padova è stato possibile studiare in modo diretto il rilascio di Ag *in vivo* e quantificare l'accumulo dell'Ag nella pelle. Lo studio è stato condotto attraverso l'analisi di biopsie cutanee prelevate da un paziente ustionato trattato con Acticoat™ Flex3.

Per la prima volta è stato possibile verificare il rilascio di AgNPs in pazienti ustionati trattati con Acticoat™ Flex3 e studiare la localizzazione subcellulare delle nanoparticelle attraverso analisi di microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Le micrografie hanno dimostrato che, durante l'applicazione su pazienti reali, l'Acticoat™ Flex3 rilascia Ag nel derma ma non nell'epidermide. Inoltre, le AgNPs vengono rilasciate in forma di agglomerati capaci di entrare nelle cellule del derma attraverso vescicole endocitotiche. Una volta entrati all'interno dei fibroblasti, gli agglomerati vengono rilasciati nel citosol e sembrano localizzarsi in prossimità dei mitocondri. Gli agglomerati non sembrano, inoltre, dissolversi completamente con il passare del tempo, ma sembrano restare nel citosol per tutto il tempo necessario alla guarigione della ferita. Sembra, infine, che la localizzazione, la forma e l'aspetto degli agglomerati cambi nel tempo. Nonostante la presenza delle AgNPs all'interno dei fibroblasti, le cellule riescono a proliferare e

a completare, così, il processo di guarigione della ferita. L'Acticoat™ Flex3 si presenta, quindi, come una medicazione sicura, che non ostacola la progressione della guarigione nei pazienti ustionati. Questa conclusione è in accordo con i dati presenti in letteratura e con le osservazioni cliniche effettuate presso il Centro Ustioni di Padova (si veda sezione 7.5).

I risultati ottenuti dalle biopsie sono coerenti con quanto osservato negli esperimenti condotti sulle colture cellulari tridimensionali: sebbene le AgNPs interagiscano con i mitocondri [235] e ne alterino pesantemente la funzionalità, questo non sembra comportare morte cellulare.

La capacità di penetrazione dell'Ag è stata valutata sul replicato delle medesime biopsie: i campioni sono stati tagliati in sezioni trasversali utilizzando un bisturi e le singole sezioni sono state mineralizzate in TMAH. I disgregati sono stati opportunamente diluiti e analizzati per quantificare la concentrazione di Ag totale nelle singole sezioni. Al termine delle analisi è stato possibile ricostruire il profilo di concentrazione dell'Ag nella pelle dei pazienti trattati e confrontare il profilo con le strutture anatomiche della pelle visualizzate attraverso colorazioni istologiche. I risultati ottenuti dimostrano che l'Ag si localizza nella parte superficiale del derma e che c'è una correlazione tra la gravità della ferita e la quantità di Ag rilasciata. Anche la distribuzione dell'Ag e la sua speciazione sembrano essere influenzate dal tipo di ferita e dalla sua gravità.

Il principale limite della strategia adottata nella prima parte del lavoro di valutazione della distribuzione dell'Ag, è rappresentato dalla bassa risoluzione spaziale che è stato possibile ottenere (circa 1 mm). Inoltre, con la strumentazione in dotazione all'Università di Venezia, non è stato possibile generare mappe di distribuzione dell'Ag ma solo profili di concentrazione. Grazie alla collaborazione con il gruppo di ricerca del Professor Feldmann l'Università di Aberdeen, dove ho svolto il periodo di ricerca all'estero, e con l'azienda Teledyne Cetac Technologies (Omaha, Nebraska, USA), è stato possibile mappare la distribuzione dell'Ag in campioni di pelle prelevati da tre pazienti ustionati trattati con Acticoat™ Flex3 mediante analisi LA-ICP-MS. I campioni sono stati prelevati durante il processo di guarigione delle ustioni e sono state ottenute mappe con risoluzione spaziale compresa tra 100 µm e 12 µm. I risultati ottenuti confermano quanto osservato nei precedenti esperimenti e gettano luce sui meccanismi di assorbimento, traslocazione e trasporto dell'Ag dalla pelle al circolo sanguigno. In particolare, è stato confermato che le AgNPs vengono rilasciate nel derma e che non sono in grado di attraversare l'epidermide. Le AgNPs, inoltre, non sembrano essere in grado di attraversare il tessuto adiposo. Per la prima volta è stata osservata la presenza di Ag nelle pareti dei vasi sanguigni. Con lo scopo di verificare e confermare le mappe di distribuzione dell'Ag, la parte rimanente di ogni biopsia mappata è stata tagliata in sezioni trasversali e

processata per ottenere i profili di concentrazione dell'Ag nei campioni analizzati. In questo capitolo, le mappe di distribuzione dell'Ag vengono presentate affiancate dal profilo di concentrazione del metallo, grazie alla scelta di destinare la maggior parte di ogni biopsia alle analisi di LA-ICP-MS e di utilizzare la parte rimanente per la quantificazione del metallo mediante mineralizzazione, analisi ICP-MS e ricostruzione del profilo.

7.1 ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI E PRELIEVO DEI CAMPIONI

Il progetto di ricerca è stato condotto rispettando tutti i requisiti etici, le linee guida e le direttive internazionali relative agli studi clinici, quali il Codice di Norimberga, la Dichiarazione di Helsinki e la Convenzione sui diritti dell'uomo e la biomedicina del Consiglio d'Europa. Tutte le attività inerenti al progetto sono state condotte secondo la regolamentazione europea, con particolare attenzione alle seguenti direttive europee: direttiva 2001/20/CE relativa all'applicazione della buona pratica clinica nell'esecuzione delle sperimentazioni cliniche di medicinali per uso clinico; le direttive 2001/83/EC, 86/609/EEC relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici e al protocollo di Amsterdam sulla protezione e sul benessere degli animali del 1997; e la decisione nr 1982/2006EC del settimo programma quadro FP7.

Tutte le biopsie sono state prelevate da pazienti ricoverati presso il Centro Ustioni di Padova, che rientravano nei criteri di idoneità e che hanno dato il consenso firmato per il prelievo di campioni per scopi scientifici e di ricerca. I pazienti sono stati considerati idonei per essere inclusi nello studio qualora presentassero ustioni a spessore parziale o totale. Il paziente B è stato inserito nel progetto in quanto affetto da sguantamento dell'arto inferiore. Lo sguantamento è un tipo di lesione che si verifica soprattutto negli arti, quando la pelle che ricopre una consistente area del corpo viene completamente staccata dai tessuti sottostanti e rovesciata. Il nome del trauma deriva dall'analogia con l'atto di rimozione di un guanto. Date le sue caratteristiche, lo sguantamento è considerato equiparabile a un'ustione a spessore totale (terzo grado). Sono stati esclusi dallo studio i pazienti che presentavano ipersensibilità nota all'Ag e ai suoi composti e/o compromissione del sistema immunitario. I pazienti non sono stati presi in considerazione nel progetto, inoltre, qualora presentassero commorbidità (ad esempio diabete, disturbi cardiaci o renali,..), ustioni causate da agenti chimici o scariche elettriche, in presenza di traumi multipli e con età inferiore ai 5 anni o superiore ai 60. Le biopsie sono state prelevate utilizzando un *punch* con diametro interno di 4 mm e lunghezza di 7 mm, e sono state ottenute da pazienti a cui è stato garantito l'anonimato, come indicato chiaramente

nel consenso informato sottoposto al paziente prima dell'arruolamento nello studio. La registrazione e l'archiviazione dei dati personali dei pazienti è stata gestita interamente dai medici e dai chirurghi del Centro Ustioni che hanno prelevato i campioni e che avevano in cura il paziente nel periodo del ricovero. Tutti i dati sensibili sono stati archiviati all'interno di un sistema informatico ad accesso limitato e sono state raccolte solo le informazioni strettamente necessarie ai fini di questo progetto di ricerca, come indicato nel consenso informato. È stato, inoltre, fatto il possibile per ridurre al minimo il numero e la tipologia di informazioni richieste. Nella documentazione sottoposta e firmata dai pazienti prima dell'inizio dello studio è stato anche esplicitato che i campioni sarebbero stati consegnati per le successive analisi in forma completamente anonima e garantendo la protezione dei dati personali del paziente. La donazione dei campioni è avvenuta in forma completamente gratuita, senza incentivi finanziari per i pazienti arruolati nello studio e garantendo al paziente la possibilità di ritirarsi dallo studio in qualunque momento, senza conseguenze.

7.1.1 Paziente A

Il paziente A è stato ricoverato presso il Centro Ustioni di Padova tra Settembre e Novembre 2012. L'ustione era localizzata negli arti inferiori ed è stata provocata da fiamme, vapori incandescenti e, probabilmente, materiale incandescente (vetro). Nel caso del paziente A tutte le biopsie sono state prelevate in duplicato: il primo campione è stato prelevato prima dell'applicazione dell'Acticoat™ Flex3. Altri campioni sono stati prelevati dopo 7 giorni di trattamento, contestualmente alla rimozione della medicazione: un campione è stato preso in duplicato da una zona trattata e guarita, mentre l'altro è stato prelevato, sempre in duplicato, da una zona vicina che, nel corso del trattamento con Acticoat™ Flex3, non era guarita e si trovava in uno stato che viene definito cruento. La ferita è stata successivamente trattata per altri 10 giorni con una nuova applicazione di medicazione contenente AgNPs. Al momento della rimozione della medicazione, un ulteriore campione è stato preso in duplicato dall'area che, nel frattempo, era guarita. Per ogni campione prelevato, il primo duplicato è stato immediatamente immerso e conservato in formalina. Il campione è stato successivamente diviso verticalmente in due metà: la prima è stata destinata alle analisi istologiche (colorazione eosina ed ematossilina), mentre la seconda è stata utilizzata nelle analisi TEM. Il duplicato, invece, è stato congelato e conservato a -20°C senza aggiungere alcun conservante ed è stato destinato alle analisi di microscopia elettronica a scansione ambientale (*Environmental Scanning Electron Microscopy, ESEM*) e alle analisi chimiche.

7.1.2 Paziente B

I campioni prelevati dal paziente B sono stati raccolti durante il ricovero che è avvenuto nel Luglio 2013. Il paziente B era in trattamento presso il Centro Ustioni per lo sguantamento dell'arto inferiore sinistro. Questo tipo di lesione è assimilabile ad un'ustione di terzo grado in quanto determina la perdita completa della cute. Le biopsie cutanee prelevate dal paziente B sono state congelate e conservate a -20°C fino al momento della preparazione delle sezioni sottili. Anche in questo caso non sono stati utilizzati agenti conservanti. I campioni sono stati prelevati in diversi momenti durante il processo di guarigione della ferita. Il primo campione è stato prelevato prima dell'applicazione dell'Acticoat™ Flex3. Il secondo campione è stato preso dopo 4 giorni di trattamento con una singola applicazione dell'Acticoat™ Flex3. I successivi campioni sono stati prelevati dopo 7 e 10 giorni di trattamento. Al momento del prelievo del campione al decimo giorno, la ferita risultava guarita e l'area trattata riepitelizzata. I campioni sono stati tagliati in sezioni sottili dello spessore di 20 µm utilizzando un vecchio criomicrotomo presente presso l'Istituto di Scienze e Tecnologie Molecolari (ISTM) del CNR, sede di Padova. Le sezioni sono state depositate su semplici vetrini da microscopia, lasciate asciugare all'aria a temperatura ambiente e conservate a -20°C fino al momento dell'analisi LA-ICP-MS. Le analisi dei campioni prelevati dal paziente B sono state eseguite durante il periodo di ricerca all'estero svolto presso il *Trace Element Speciation Laboratory* dell'Università di Aberdeen, utilizzando un sistema di introduzione ad ablazione laser New Wave UP-213 (New Wave Research, ESI, Huntingdon, Cambridge, Regno Unito) accoppiato a un ICP-MS 7500c (Agilent Technologies, Tokio, Giappone).

7.1.3 Paziente C

Il paziente C è stato ricoverato nel Dicembre 2013 e presentava un'ustione da fiamma, a spessore parziale, degli arti inferiori. A differenza dei precedenti pazienti, il paziente C è arrivato presso il Centro Ustioni dopo un breve ricovero presso un piccolo ospedale poco distante da Padova. Nel corso del primo ricovero il paziente è stato trattato con una crema antibiotica contenente argento sulfadiazina. Il primo campione di cute è stato prelevato dalla regione mediale (coscia) al momento dell'arrivo al Centro Ustioni, prima dell'applicazione dell'Acticoat™ Flex3. Il secondo campione è stato prelevato dalla stessa area, dopo 5 giorni di trattamento con una singola applicazione della medicazione. I campioni sono stati immediatamente congelati e conservati a -20°C. Le sezioni sottili sono state preparate con le stesse modalità descritte nel paragrafo 7.1.2 ed analizzate presso l'Università Ca' Foscari di

Venezia utilizzando un'unità laser ablation Cetac LSX 213 (Teledyne Cetac Technologies, Omaha, Nebraska, USA) equipaggiata con una supercella a due volumi HelEx™ e accoppiata con un ICP-MS 7500cx (Agilent Technologies, Tokio, Giappone).

7.1.4 Paziente D

Il paziente D era in trattamento presso il Centro Ustioni a Gennaio 2014 per un'ustione da fiamma a tutto spessore (terzo grado) che coinvolgeva il torace. I campioni del paziente C sono stati presi dalla zona ascellare. Il primo campione è stato prelevato prima dell'applicazione della medicazione contenente AgNPs. Il secondo campione è stato prelevato dopo 7 giorni di trattamento, mentre il terzo campione è stato preso dopo 15 giorni. La conservazione e la preparazione dei campioni sono state eseguite come descritto nei paragrafi precedenti e, anche in questo caso, le sezioni sono state analizzate presso l'Università Ca' Foscari di Venezia utilizzando l'unità laser ablation Cetac LSX 213 accoppiata all'ICP-MS 7500 cx.

7.2 STUDI DI MICROSCOPIA OTTICA, TEM E ESEM

7.2.1 PARTE SPERIMENTALE

Le analisi di microscopia, sia ottica sia elettronica sono state condotte solo sui campioni prelevati dal paziente A. Per questo studio sono stati utilizzati i replicati che erano stati conservati in formalina, e che erano stati divisi in due metà mediante taglio verticale. Di ogni campione la prima metà è stata sottoposta a colorazione eosina ematossilina (colorazione H/E) con lo scopo di valutare i cambiamenti nella struttura del tessuto durante il processo di guarigione. I campioni sono stati inclusi in paraffina, tagliati in sezioni con un microtomo, colorati con eosina ed ematossilina ed osservati al microscopio ottico. Questa parte del lavoro è stata condotta presso il Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Padova. La seconda metà di ogni campione è stata destinata, invece, alle analisi TEM.

Prima di effettuare le analisi di microscopia elettronica, è stata condotta un'indagine preliminare finalizzata ad individuare le aree più compromesse e morfologicamente alterate. Queste zone, infatti, erano nella parte più superficiale del campione ed avevano una maggiore probabilità di contenere AgNPs, in quanto erano state a contatto diretto con l' Acticoat™ Flex3. Dai campioni sono state ottenute alcune sezioni semifini utilizzando una minima parte di ogni campione. La maggior parte del campione è rimasto, invece, integro ed utilizzabile per le analisi TEM. Le sezioni semifini sono state colorate con una goccia di blu di toluidina (1% blu di

toluidina, 1% borace per microscopia ottica), osservate al microscopio ottico e ne sono state individuate le aree di interesse. Le aree selezionate sono state ricampionate nel campione di biopsia e sottoposte ad analisi TEM con lo scopo di studiare la distribuzione e la localizzazione subcellulare delle AgNPs. I campioni di biopsie sono stati fissati per tutta la notte a 4° C in un tampone di glutaraldeide 2.5% / acido dimetilarsinico sale sodico 0.1 M. I campioni sono stati trattati con il tampone tetrossido di osmio 1% / acido dimetilarsinico sale sodico 0.1 M, disidratati utilizzando soluzioni di etanolo a concentrazione crescente e inclusi in resina epossidica EPON™. Sezioni ultrafini sono state ottenute tagliando i campioni con un ultramicrotomo (LKB, Stoccolma, Svezia) e colorate con 1% uranilacetato e 1% citrato di piombo. I campioni sono stati analizzati mediante analisi TEM presso il Servizio di Microscopia Elettronica del Dipartimento di Biologia, dell'Università di Padova, utilizzando un microscopio elettronico Tecnai G12 (FEI, voltaggio di accelerazione 100 kV), con fotocamera digitale ad alta risoluzione TIETZ (Tietz Video and Image Processing Systems GmbH, Gauting, Germania).

Il replicato destinato alle analisi ICP-MS è stato sottoposto ad analisi ESEM con lo scopo di verificare la presenza di Ag nella cute ed avere un'indicazione sulle specie di Ag presenti. Le analisi ESEM sono state effettuate presso il C.U.G.A.S. (Centro Universitario Grandi Apparecchiature Scientifiche) dell'Università di Padova utilizzando un microscopio Quanta 200 (FEI company, Hillsboro, OR, USA), dotato di detector EDAX (EDAX Inc; Mahwah, NJ, USA). I campioni sono stati asciugati per 24 ore in un forno termostato a 37°C, e successivamente sono stati analizzati direttamente senza metallizzazioni. Le immagini degli elettroni retrodiffusi sono state acquisite a 25kV e sono stati acquisiti gli spettri EDS delle zone più rappresentative, al fine di ottenere un'indicazione qualitativa sulla composizione elementare delle particelle osservate sulla superficie del campione.

7.2.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

Le immagini al microscopio ottico delle biopsie cutanee colorate con eosina ed ematossilina mostrano importanti differenze tra i campioni. In figura 15a è riportata un'immagine della biopsia prelevata dalla pelle ustionata del paziente A dopo la pulizia chirurgica della ferita. Questo campione è stato prelevato prima dell'applicazione dell'Acticoat™ Flex3. Le figure 15b e 15c mostrano la pelle prelevata dall'area guarita dopo 7 giorni di trattamento, mentre le figure 15d e 15e presentano il campione preso contestualmente dall'area non guarita. In figura 15f, invece, è possibile osservare il campione preso dalla zona guarita dopo 17 giorni di trattamento con due applicazioni di Acticoat™ Flex3.

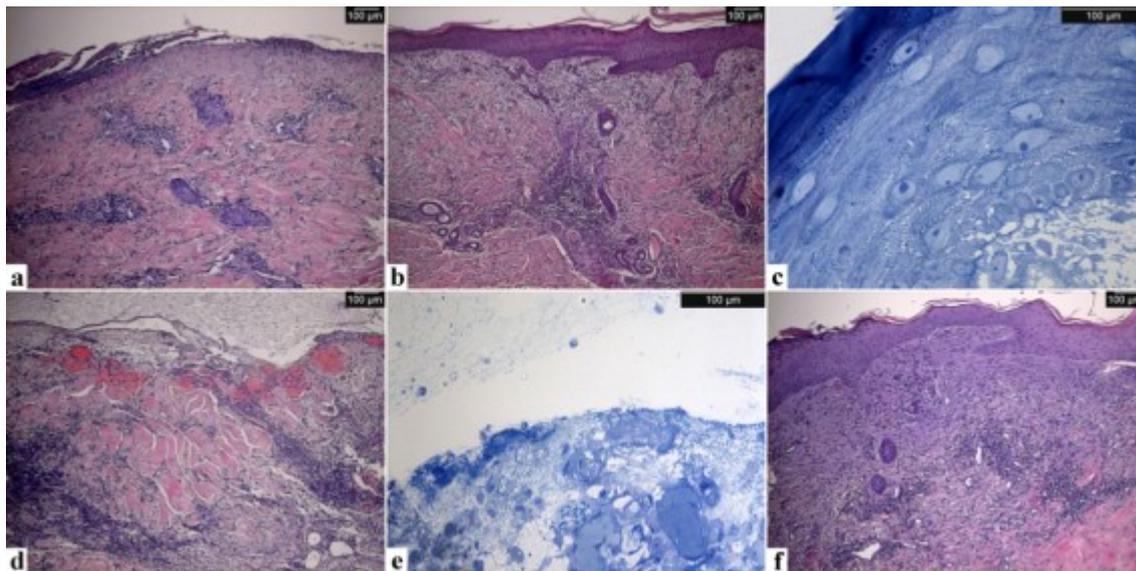


Figura 15: Immagini dei campioni prelevati dal paziente A ottenute mediante colorazione H/E e microscopia ottica **a)** pelle ustionata prima del trattamento con Acticoat™ Flex3. **b e c)** pelle guarita dopo 7 giorni di trattamento. **d ed e)** pelle non guarita dopo 7 giorni. **f)** ferita completamente guarita e riepitelizzata dopo una seconda applicazione di Acticoat™ Flex3 e ulteriori 10 giorni di trattamento con la nuova medicazione. Le sezioni relative ai campioni prelevati dopo una settimana di trattamento sono presentate colorate sia con H/E che con blu di toluidina. Barra di scala: 100 µm.

Prima dell'applicazione della medicazione contenente AgNPs, la pelle ustionata presenta caratteristiche tipiche delle ustioni profonde: sono visibili necrosi dell'epidermide, diffusa infiltrazione perivascolare e una importante degradazione del collagene a livello del derma papillare (figura 15a). Dopo 7 giorni di trattamento con Acticoat™ Flex3, nell'area guarita la struttura dei tessuti è stata completamente ripristinata (figura 15b). Attraverso la colorazione con blu di toluidina (figura 15c) è possibile osservare come la pelle guarita sia composta da una nuova epidermide ben stratificata, e siano presenti lo strato basale, lo strato spinoso, quello granuloso e lo strato corneo. L'osservazione al microscopio evidenzia, inoltre, la presenza di una buona vascolarizzazione nell'interfaccia tra il derma e il tessuto subcutaneo. Diversamente, nel campione di pelle prelevato dall'area non guarita (figura 15d,e), la struttura della cute non è stata ancora ripristinata. L'epidermide non è ancora ricresciuta (figura 15d) mentre il derma presenta una struttura disorganizzata ed irregolare (figura 15e). La ferita è stata trattata con una seconda applicazione di medicazione contenente AgNPs per ulteriori 10 giorni. Al momento della rimozione della medicazione, la ferita appariva guarita. Una nuova biopsia in duplicato è stata prelevata dall'area per verificare se l'architettura del tessuto fosse stata effettivamente ripristinata. Le osservazioni del campione al microscopio ottico (figura

15f) confermano che la struttura del tessuto dermico è stata ricostruita. Inoltre, è possibile osservare la formazione di una nuova epidermide.

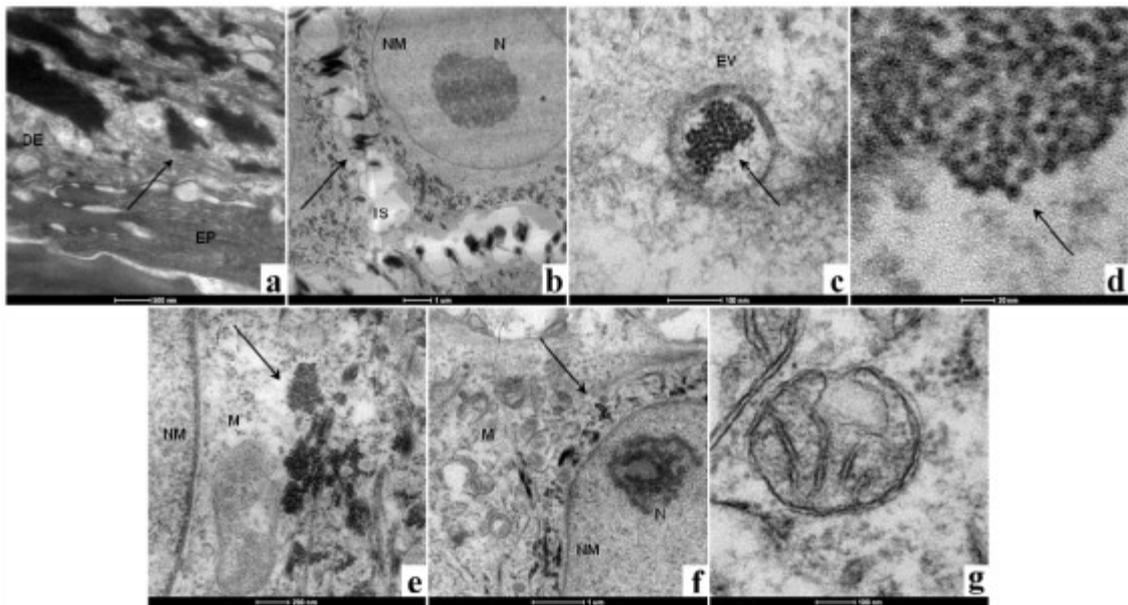


Figura 16: Immagini al TEM del campione di pelle prelevato dall'area guarita dopo 7 giorni di trattamento con Acticoat™ Flex3. **a)** epidermide e derma. **b)** dettaglio di 3 fibroblasti circondati da agglomerati di AgNPs nella parte superficiale del derma. **c)** vescicola endocitotica contenente agglomerati di AgNPs. **d)** ingrandimento della vescicola endocitotica contenente gli agglomerati di AgNPs. **e)** agglomerati di AgNPs dopo il loro rilascio nel citoplasma. Gli agglomerati si localizzano in prossimità dei mitocondri. **f)** un fibroblasto della parte inferiore del derma: gli agglomerati di AgNPs si localizzano vicino alla membrana nucleare. **g)** un mitocondrio intero e in buono stato. Legenda: DE, derma; EP, epidermide; EV, vescicola endocitotica; IS, spazio intercellulare; M, mitocondrio; N, nucleolo; NM, membrana nucleare. Le frecce indicano gli agglomerati di AgNPs. Barra di scala: **(a)** 500 nm; **(b)** 1 μ m; **(c)** 100 nm; **(d)** 20 nm; **(e)** 200 nm; **(f)** 1 μ m; **(g)** 100 nm.

La completa guarigione della ferita al diciassettesimo giorno di trattamento suggerisce che, nonostante la presenza di AgNPs nel tessuto e all'interno delle cellule, il processo di guarigione delle ferite non sia ostacolato. I risultati di questo studio condotto sul paziente A sono in accordo e supportano il lavoro di ricerca recentemente pubblicato da Gravante e collaboratori [236]. In questo studio è stato dimostrato che, tra tutti i prodotti comunemente utilizzati per il trattamento delle ferite, l'Acticoat™ Flex3 rappresenta la medicazione con il più corto tempo di guarigione delle ustioni a spessore parziale. La media del tempo di guarigione osservata da Gravante era pari a 16 giorni, molto simile al valore da noi riscontrato nello studio sul paziente A (17 giorni). Il confronto dei tempi di guarigione ottenibili con altri prodotti ha evidenziato come siano necessari, mediamente 21 giorni, se le ustioni sono trattate con medicazioni a base di sodio carbossimetilcellulosa, 26.5 giorni con garze paraffinate e 29 giorni con una crema

contenente collagenasi. Questi dati confermano che il processo di guarigione non viene compromesso durante il trattamento con AgNPs.

Le immagini al TEM del campione di pelle prelevata dall'area guarita dopo 7 giorni di trattamento sono riportate in figura 16a-g. Il campione è stato osservato dall'epidermide fino al punto in cui non sono state più osservate AgNPs, ovvero a circa 3 mm di profondità. In figura 16a si osserva un gran numero di agglomerati di AgNPs nella parte superiore del derma. Non sono state osservate AgNPs singole o agglomerati nell'epidermide. Utilizzando un ingrandimento superiore, è possibile notare come gli agglomerati di AgNPs siano localizzati nella matrice extracellulare, in prossimità della membrana plasmatica. In figura 16b si osserva una leggera espansione dello spazio intercellulare, probabilmente causata dalla precedente fase di infiammazione in accordo con quanto osservato da Xu [237]. In figura 16c è presente una vescicola endocitotica contenente agglomerati di AgNPs. Le AgNPs, quindi, entrano all'interno dei fibroblasti in forma di agglomerati e utilizzando vescicole endocitotiche, come già dimostrato separatamente da Kim [238] e Greulich [239], in diverse linee cellulari. Le singole nanoparticelle, visibili in figura 16d, sono state misurate ed è stato verificato che hanno un diametro medio di poco inferiore a 10 nm. Una volta rilasciati nel citoplasma (figura 16e), gli agglomerati di AgNPs presentano, nella maggior parte dei casi, una forma tonda e si localizzano vicino ai mitocondri (etichettati con la lettera M). Non sono state individuate AgNPs singole o agglomerati nel nucleo (indicato come NM), come osservato anche da Drescher e collaboratori [240], e non sono stati ravvisati segni di frammentazione nucleare. Nonostante la presenza delle AgNPs nel nucleo, la membrana nucleare è integra e arrotondata. Il nucleolo visibile in figura 16b (etichettato con la lettera N) conferma che la cromatina non è condensata ma si presenta nella configurazione che consente l'accesso agli enzimi coinvolti nel processo di trascrizione del DNA. In figura 16e è possibile notare come i mitocondri si localizzino in prossimità della membrana nucleare.

In questo campione, che è stato prelevato dall'area guarita dopo 7 giorni di trattamento, è stato osservato che i fibroblasti della parte superiore del derma sembrano essere caratterizzati da una particolare distribuzione dei mitocondri. È stato ipotizzato, durante questo lavoro di ricerca, che i fibroblasti abbiano replicato questi organelli e che i microtubuli li abbiano poi spostati e posizionati [241, 242] intorno al nucleo per proteggere il DNA dai possibili danni causati dalle AgNPs. È stato già dimostrato in diverse linee cellulari che le AgNPs sono in grado di generare ROS all'interno delle cellule [47, 49] e che queste specie reattive possono danneggiare il materiale genetico [223]. È stato, quindi, ipotizzato in questa ricerca che una volta che le AgNPs sono state rilasciate nel citoplasma, generino ROS. Questo fenomeno può

determinare un aumento del numero dei mitocondri, come risposta allo stress ossidativo. Il fenomeno è stato già osservato nel passato da Lee e collaboratori [243]. L'incremento del numero di mitocondri potrebbe essere un tentativo di compensare la ridotta attività di questi organelli: la riduzione dell'attività metabolica è stata osservata anche nel corso degli studi condotti su colture cellulari tridimensionali trattate con Acticoat™ Flex3, descritti nel paragrafo 6.2. In questo lavoro di ricerca è stato, quindi, ipotizzato che i mitocondri vengano spostati dai microtubuli intorno al nucleo, con lo scopo di utilizzarli come una barriera fisica e "chimica" che impedisca ai ROS e alle AgNPs di raggiungere la membrana nucleare. Nel caso in cui la membrana mitocondriale venga danneggiata dall'azione dei ROS, verranno rilasciati nel citoplasma isoforme mitocondriali di enzimi antiossidanti (ad esempio, superossidodismutasi mitocondriale, catalasi, glutatione perossidasi e tioredossina perossidasi [244]). La presenza e l'azione di questi enzimi nel citoplasma porterà all'estinzione (*quenching*) dei ROS. È stato già dimostrato nel passato che le AgNPs e l'Ag⁺ provocano un aumento della concentrazione della superossidodismutasi (SOD) in cellule umane [245] e in lievito [246], e che la somministrazione di sistemi *scavenger*, quali SOD, catalasi, mannitolo e selenito di sodio, possano parzialmente bloccare gli effetti genotossici delle AgNPs in cellule dell'epitelio bronchiale umano [245].

Nella parte più bassa del derma (figura 16f, g), gli agglomerati di AgNPs hanno un aspetto e una localizzazione diversa all'interno dei fibroblasti, se confrontati con la forma e la posizione osservate nelle cellule della parte superiore del tessuto dermico. Gli agglomerati di AgNPs si presentano, infatti, allungati e sono stati osservati molto vicini alla membrana nucleare. I mitocondri (indicati con M) si trovano generalmente distanti dagli agglomerati (indicati con una freccia), e appaiono come integri e in buono stato (figura 16g). Poiché l'Acticoat™ Flex3 è stato applicato sulla superficie dell'ustione, le cellule che si trovavano sul fondo della ferita (parte inferiore del derma) sono state le prime ad entrare in contatto con le AgNPs rilasciate dalla medicazione. Inoltre, queste cellule sono state esposte agli aggregati di AgNPs per un arco di tempo più lungo rispetto ai fibroblasti che si trovano nella parte superiore del derma. In questo intervallo di tempo, le AgNPs possono essere andate incontro a reazioni chimiche che ne hanno passivato la superficie, o che hanno annullato la loro capacità di generare ROS. Alla luce di queste ipotesi, le AgNPs potrebbero restare all'interno delle cellule senza provocare effetti tossici. Questa teoria potrebbe spiegare le diverse distribuzioni spaziali degli agglomerati di AgNPs osservate nei fibroblasti della parte alta e bassa del derma. Trattandosi di un'ipotesi, ulteriori approfondimenti risultano necessari.

Nel campione di pelle prelevato dall'area non guarita, la struttura del tessuto dermico è altamente disorganizzata e l'epidermide non si è ancora riformata. Le immagini al TEM

riportate in figura 17a,b mostrano delle vescicole contenenti materiale elettrondenso. Purtroppo non è stato possibile verificare se questo materiale contenesse Ag. Diversamente da quanto osservato nel campione di pelle guarita, nel campione prelevato dall'area cruenta non è stato possibile rivelare la presenza di AgNPs. È però possibile che la materia elettrondensa osservata nel campione sia composta da sali di Ag o da Ag legato a proteine attraverso i gruppi solfuro o seleniuro, e poi precipitate [247-249].

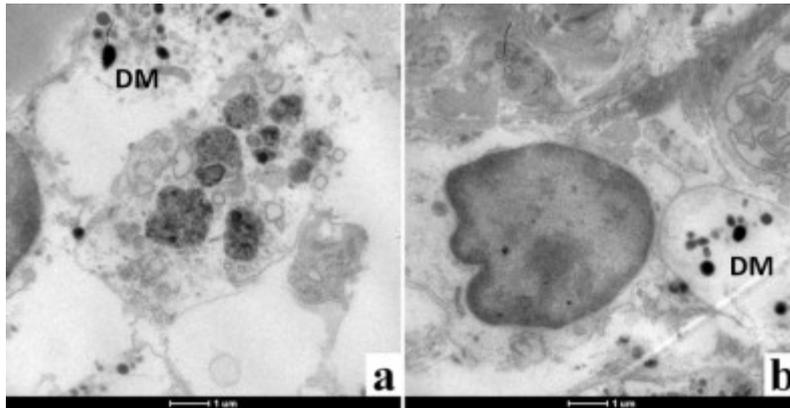


Figura 17: Immagini al TEM del campione prelevato dall'area non guarita. DM: materia elettrondensa contenuta all'interno di vescicole. Barra di scala: 1 µm.

Le analisi effettuate al ESEM dimostrano la presenza di particelle sulla superficie del campione di pelle prelevato dall'area non guarita. Come mostrato in figura 18a, le particelle individuate hanno un diametro inferiore a 10 µm. Lo spettro EDS (figura 18b) mostra che le particelle sono composte esclusivamente da Ag metallico. Nel campione di pelle prelevato dall'area guarita non è stato, invece, possibile identificare nessuna specie di Ag. Questo risultato è probabilmente dovuto alla bassa sensibilità della tecnica analitica utilizzata e all'assenza di microparticelle sulla superficie di questo campione. Infine, l'analisi ESEM del campione di pelle prelevato dall'area trattata per 17 giorni con due applicazioni di Acticoat™ Flex3 ha evidenziato la presenza di microparticelle di Ag.

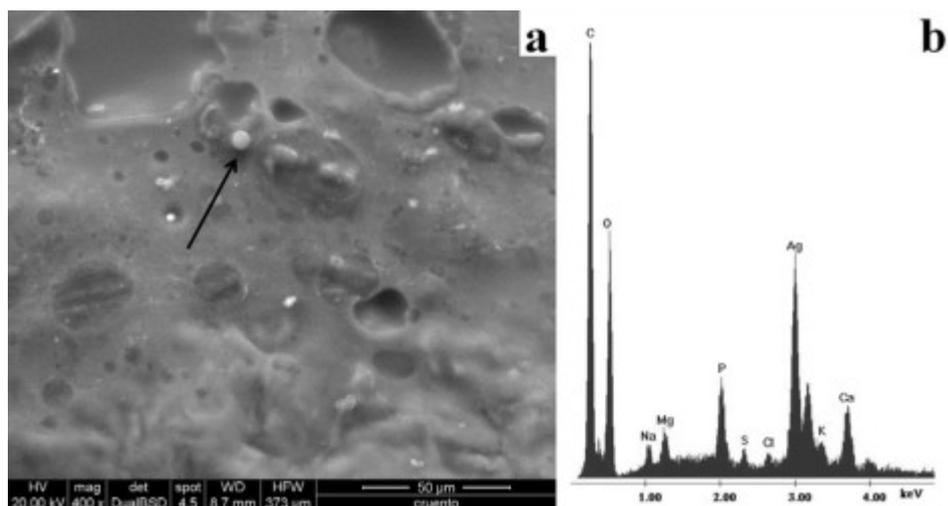


Figura 18: a) Immagine ESEM del campione di pelle prelevato dall'area non guarita. b) spettro EDS della particella indicata dalla freccia. Barra di scala: 50µm

7.3 RILASCI E PROFILI DI CONCENTRAZIONE DELL'ARGENTO

7.3.1 PARTE SPERIMENTALE

Al termine delle analisi ESEM, i campioni di biopsie cutanee prelevati dal paziente A sono stati tagliati in sezioni trasversali di circa 2 mg di peso. I campioni sono stati tagliati a mano, utilizzando un bisturi usa e getta. Le singole sezioni ottenute sono state trasferite in microprovette e mineralizzate con 100 µL di TMAH. La disgregazione è stata condotta per tutta la notte in bagno termostato a 60°C. Immediatamente prima delle analisi ICP-MS, i digeriti sono stati diluiti 200 volte in una soluzione Triton X-100 0.1% v/p e NH₄OH 2.8% m/m e la concentrazione totale di Ag è stata quantificata utilizzando la calibrazione esterna, secondo le modalità riportate nella sezione 6.4.

Le biopsie cutanee prelevate dai pazienti B, C e D sono state tagliate con il criomicrotomo per ottenere sezioni sottili da destinare alle analisi LA-ICP-MS (per ulteriori dettagli si veda la sezione 7.4). Una volta ottenuto un numero sufficiente di sezioni sottili, il rimanente campione è stato tagliato in sezioni trasversali e mineralizzato come descritto nel precedente paragrafo. Nel caso del campione prelevato dal paziente D, è stato necessario diluire i digeriti 400 volte per ottenere un valore di concentrazione di Ag che ricadesse all'interno della curva di calibrazione.

7.3.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

In figura 19 sono presentati i profili di concentrazione dell'Ag nelle biopsie prelevate dal paziente A dopo 7 giorni di trattamento. I campioni sono stati presi dall'area guarita e dall'area cruenta. La figura 19 mostra come nel campione prelevato dalla zona guarita la concentrazione di Ag diminuisca molto rapidamente passando da $50.8 \pm 0.8 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ misurati nella sezione più superficiale, a $6.0 \pm 0.2 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ quantificati nella seconda sezione. Questo andamento continua anche nelle sezioni successive e in questa parte del campione la concentrazione di Ag varia tra 0.04 e $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$. Nel campione prelevato dall'area non guarita, sebbene la concentrazione di Ag nella sezione più superficiale sia leggermente più bassa ($37.5 \pm 0.6 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$), la diminuzione della concentrazione di Ag lungo il profilo è più graduale e meno marcata rispetto a quella osservata nel campione preso dall'area guarita: nella seconda e nella terza sezione del campione, infatti, la concentrazione di Ag è pari rispettivamente a 29.8 ± 0.5 e $9.6 \pm 0.2 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$. La quantità totale di Ag nel campione prelevato dall'area cruenta è pari a 223 ng, un valore leggermente superiore a quello misurato nel campione prelevato dalla zona guarita (171 ng). Il campione che è stato prelevato dopo una seconda applicazione di Acticoat™ Flex3 e ulteriori 10 giorni di trattamento, presenta un profilo di concentrazione simile a quello osservato nel campione guarito e che era stato trattato per 7 giorni. È interessante notare che, sebbene l'andamento del profilo di concentrazione sia simile, la concentrazione di Ag misurata nel campione trattato con due applicazioni è praticamente doppia rispetto a quella misurata nel campione trattato con una singola applicazione di Acticoat™ Flex3: la concentrazione misurata nelle prime tre sezioni del campione sottoposto a due applicazioni di AgNPs sono rispettivamente 110 ± 2 , 31.0 ± 0.7 e $13.2 \pm 0.1 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$.

In figura 19 è presentato, inoltre, il confronto tra i profili di concentrazione di Ag nei campioni di biopsia cutanea e le colorazioni istologiche con blu di toluidina effettuate sui replicati degli stessi. L'affiancamento delle immagini consente di correlare la capacità di penetrazione dell'Ag nei tessuti con l'organizzazione strutturale di questi. Il campione di pelle prelevato dall'area guarita presenta la tipica struttura ben organizzata del tessuto sano. Grazie alla struttura ben organizzata e compatta della cute guarita, gli agglomerati di AgNPs rilasciati dall'Acticoat™ Flex3 non sono in grado di raggiungere gli strati più profondi del derma, ma rimangono immobilizzati prevalentemente negli strati mediani e superficiali del tessuto dermico. Con il procedere della guarigione della lesione e della sua riepitelizzazione, i fibroblasti contenenti gli agglomerati di AgNPs vengono coperti dai cheratinociti che hanno formato la nuova epidermide. Al contrario il campione di cute prelevato dall'area non guarita è caratterizzato da un'architettura caotica e disordinata: la normale organizzazione del tessuto connettivo non è

stata ancora ristabilita, i fibroblasti sono poco numerosi e molto distanziati tra loro. La mancanza di un tessuto compatto e ben formato consente alle AgNPs rilasciate dalla medicazione di raggiungere gli strati più profondi del derma.

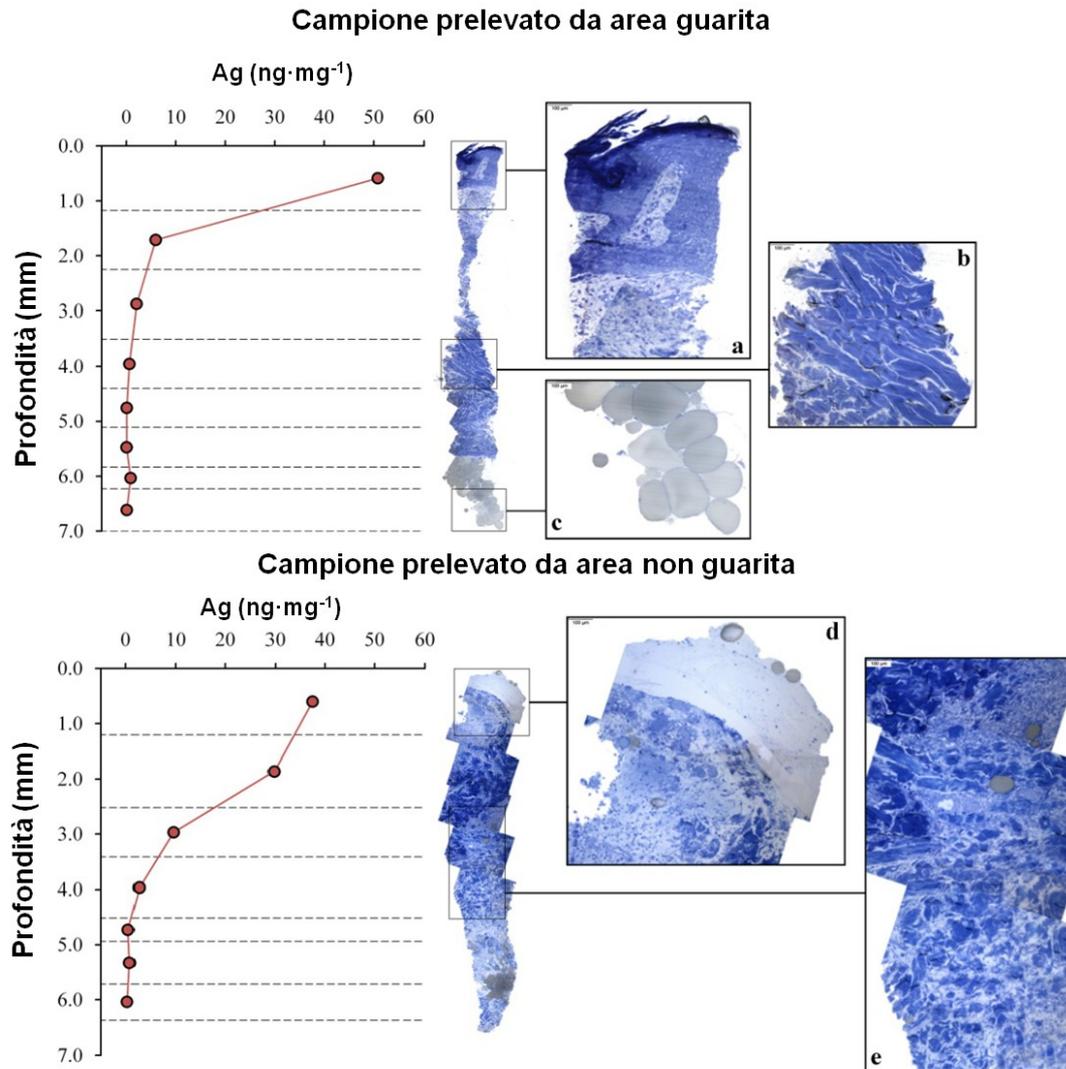


Figura 19: Profili di concentrazione dell'Ag ($\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$) dopo 7 giorni di trattamento. In questo studio pilota, le biopsie destinate alle analisi dell'Ag sono state prese da un unico paziente. Una biopsia è stata prelevata da un'area guarita dell'ustione (parte alta dell'immagine), mentre l'altra biopsia è stata presa da un'area non guarita (parte bassa dell'immagine). Immagini delle colorazioni istologiche effettuate sul replicato del campione sono state ottenute attraverso analisi di microscopia ottica. Per confrontare i due campioni sono presentati ingrandimenti di aree particolarmente interessanti e rappresentative della struttura dei tessuti.

Come precedentemente osservato attraverso gli esperimenti condotti sulle colture cellulari tridimensionali e la quantificazione dell'Ag nelle frazioni MTT e iDMSO (si veda la sezione 6.4), anche nei campioni di pelle la concentrazione di Ag aumenta linearmente con il numero di medicazioni applicate. Il campione di pelle prelevato dal paziente A dopo due applicazioni di

Acticoat™ Flex3, infatti, presenta una concentrazione di Ag totale doppia (424 ng di Ag) rispetto a quella misurata nel campione di pelle prelevato dalla zona non guarita dopo un singolo trattamento con la medicazione (223 ng di Ag). Il fatto che la concentrazione totale di Ag nel campione non guarito sia leggermente più alta rispetto a quella misurata nel campione guarito a parità di tempo di trattamento e numero di applicazioni dell'Acticoat™ Flex 3, si può spiegare tenendo in considerazione che la presenza di essudati e fluidi corporei può aumentare il rilascio di Ag da parte della medicazione [86, 247].

7.4 STUDIO DELLA DISTRIBUZIONE DELL'ARGENTO E DELLO ZINCO NELLA PELLE

In questa parte del lavoro sono state analizzate mediante LA-ICP-MS le sezioni sottili ottenute dalle biopsie cutanee prelevate dai pazienti B, C, D. Le biopsie sono state prese in momenti diversi, durante il processo di guarigione della ferita e contestualmente al cambio delle medicazioni.

Sono state ottenute le mappe di distribuzione del carbonio (^{13}C), del fosforo (^{31}P), dello zolfo (^{34}S), dell'argento (^{107}Ag e ^{109}Ag) e dello zinco (^{67}Zn) con una risoluzione spaziale compresa tra 100 μm e 12 μm . È importante sottolineare che, nonostante il LA-ICP-MS garantisca un'alta risoluzione, questa non è sufficiente per discriminare tra la presenza di Ag^+ e di AgNPs all'interno dei campioni di pelle. Inoltre, essendo l'ICP-MS una tecnica distruttiva, non è in grado di fornire informazioni molecolari e sulla speciazione degli analiti presenti. Per questo motivo, nel testo si fa riferimento alla distribuzione degli elementi nei campioni senza dare indicazioni in merito alle specie presenti. Le analisi condotte dimostrano che, durante il trattamento, l'Ag viene rilasciato nel derma. In seguito alla guarigione della ferita, l'Ag che viene rilasciato sulla sommità della cute non è in grado di attraversare la nuova epidermide. Non è stata osservata presenza di Ag nel tessuto adiposo subcutaneo ma solo all'interno del derma. In due sezioni sottili provenienti dal campione prelevato dal paziente D è stato notato un vaso sanguigno contenente Ag.

Nei medesimi campioni è stata, inoltre, valutata la distribuzione dello zinco. Lo zinco è un elemento essenziale [250] ed è uno degli elementi in traccia più presenti nel corpo umano: la quantità di zinco presente nel corpo di un adulto è pari a 2-3 g [251]. Lo zinco si localizza nel derma e nell'epidermide, formando complessi con proteine. Lo zinco agisce come cofattore, come stabilizzatore delle membrane cellulari [252] e riveste un ruolo fondamentale nella mitosi, nella migrazione e nella maturazione delle cellule nel processo di guarigione delle ferite

[253]. La concentrazione tissutale di zinco e la sua distribuzione giocano un ruolo fondamentale nel progredire della riparazione delle lesioni: attraverso studi condotti su modelli di ferite, è stato osservato un aumento della concentrazione dello zinco nelle fasi iniziali dell'infiammazione. Questo incremento risulta più marcato nei bordi della lesione [254]. Inoltre, in questa fase si assiste a un aumento nella concentrazione tissutale delle MMPs, una famiglia di enzimi litici in grado di degradare la matrice extracellulare, caratterizzati dalla presenza di zinco nel sito catalitico [68, 69]. Nelle fasi terminali del processo di guarigione, la concentrazione di zinco nel tessuto diminuisce e questa riduzione è associata ad una ridotta attività mitotica, e all'inizio della fase di maturazione del tessuto cicatriziale [254]. Per queste ragioni lo zinco è ritenuto un marcatore del processo infiammatorio. Le analisi condotte sulle sezioni sottili ottenute dalle biopsie cutanee suggeriscono che il trattamento con AgNPs alteri la distribuzione dello zinco, ne riduca la quantità nel tessuto infiammato e promuova la guarigione della lesione.

7.4.1 PREPARAZIONE DELLE SEZIONI SOTTILI, ANALISI MEDIANTE LA-ICP-MS E STUDIO DEI PROFILI DI CONCENTRAZIONE DELL'ARGENTO

Le biopsie sono state prelevate utilizzando un *punch* (diametro interno 4 mm, lunghezza 7 mm). I campioni sono stati congelati immediatamente senza l'aggiunta di fissativi, per mantenere inalterata la distribuzione degli elementi, in particolare dell'Ag. Sezioni longitudinali (20 μm di spessore) sono state ottenute tagliando i campioni con un criomicrotomo alla temperatura di circa -18°C . I campioni sono stati montati sul portacampione del criomicrotomo utilizzando la resina OCT e mantenendo sempre lo stesso orientamento. I campioni sono stati tagliati lungo il bordo laterale per ridurre al minimo il rischio di contaminazioni dovute al trascinarsi dell'Ag (*smearing*) dalle aree a più alta concentrazione verso le aree meno concentrate [142]. Le sezioni sottili sono state depositate su vetrini da microscopia e lasciate asciugare per tutta la notte a temperatura ambiente. Le sezioni provenienti dai campioni prelevati dal paziente B sono state analizzate presso l'Università di Aberdeen (Scozia, Regno Unito) utilizzando un sistema di introduzione ad ablazione laser New Wave 213 UP dotato di cella a volume normale, e accoppiato ad uno strumento Agilent 7500c. Diversamente, le sezioni sottili ottenute dai pazienti C e D sono state analizzate presso l'Università Ca' Foscari utilizzando un sistema laser Cetac LSX 213 corredato di cella di ultima generazione HelEx™, e accoppiato a uno strumento Agilent 7500cx.

Sebbene il confronto tra le prestazioni delle due unità di ablazione laser non sia oggetto di questo lavoro di tesi, è riportata qui di seguito una breve descrizione dei due sistemi di introduzione del campione e dei parametri strumentali impostati per le analisi LA-ICP-MS. Il sistema di introduzione del campione New Wave 213 UP, ad esempio, è dotato di un laser meno potente rispetto a quello presente nel sistema Cetac LSX 213. I campioni analizzati in questo lavoro di ricerca sono molto simili tra di loro e presentano tutti lo stesso spessore (20 μm). Per poter ottenere un'ablazione completa del campione e minimizzare l'ablazione del vetrino sottostante, è stato necessario impostare l'energia del laser tra il 35 e il 45% nel sistema New Wave 213 UP, e al 10% nel sistema Cetac LSX 213. Sebbene il sistema New Wave 213 UP consenta di utilizzare l'elio, o miscele argon/elio, come gas di trasporto, le analisi effettuate presso l'Università di Aberdeen sono state condotte utilizzando solo l'argon proveniente dall'ICP-MS. Gli esperimenti svolti nel corso degli anni e le varie prove effettuate dai ricercatori del gruppo del professor Feldmann, hanno permesso di riuscire a ottenere prestazioni strumentali simili utilizzando solo argon come gas di trasporto, invece della miscela argon/elio. Questo ha determinato anche un risparmio economico e ha ridotto il costo di gestione dell'unità laser. Diversamente, nel caso del sistema Cetac LSX 213, è stato necessario usare una miscela di argon/elio per condurre le analisi. Il sistema, infatti, era equipaggiato con la cella HelEx™, all'interno della quale due flussi di gas (He1 e He2) percorrono traiettorie a vortice e sono controllati indipendentemente. Secondo quanto suggerito dal tecnico che ha eseguito l'installazione presso l'Università Ca' Foscari, le prestazioni della cella sono migliori nel caso in cui venga utilizzato gas elio all'interno delle due linee He1 e He2 e, come gas di trasporto, l'argon proveniente dall'ICP-MS. L'ottimizzazione dei parametri strumentali (*tuning*), che viene condotta giornalmente prima di iniziare le analisi, prevedeva, quindi, anche un controllo del rapporto tra i flussi di elio (He1 e He2) e di argon. Come già accennato nella sezione 2.2.2, la geometria della cella HelEx™ e l'ottimizzazione separata dei flussi, permette di limitare la perdita di materiale ablatato e di ridurre i tempi di dilavamento del sistema, incrementando, in questo modo, la risoluzione spaziale. Purtroppo non è stato possibile fare un confronto con la corrispondente cella a due volumi del sistema New Wave 213 UP (SuperCell™), in quanto era stata pesantemente danneggiata poco prima del mio arrivo all'Università di Aberdeen. Poiché la cella quadrata a due volumi era inutilizzabile, i campioni sono stati analizzati usando la cella di ablazione standard.

L'ottimizzazione giornaliera dei parametri strumentali è necessaria per ottenere dei buoni risultati: per entrambe le strumentazioni il *tuning* è stato effettuato a mano, prima di ogni sessione di analisi e utilizzando il materiale di riferimento NIST612 (elementi in traccia in vetro,

National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland, USA). Per entrambe le unità di ablazione laser sono stati ottimizzati i parametri quali flussi dei gas e voltaggi delle lenti ioniche dell'ICP-MS, in modo da massimizzare sia la sensibilità, sia la stabilità del segnale in riferimento ai rapporti m/z 7, 89, 139, 175, e 208. In tutte le sessioni sperimentali, durante il *tuning*, è stato fatto il possibile affinché la deviazione standard relativa percentuale della media dei conteggi dei rapporti m/z 7, 89, 139, 175, e 208 fosse sempre inferiore al 5%.

Gli ossidi sono stati monitorati attraverso il rapporto $^{232}\text{Th}^{16}\text{O}^+ / ^{232}\text{Th}^+$ e sono stati mantenuti inferiori all'1%. Durante il *tuning* è fondamentale ottimizzare i parametri in modo da avere un valore unitario nel rapporto $^{232}\text{Th}^+ / ^{238}\text{U}^+$. Queste condizioni, infatti, consentono di ridurre il più possibile il frazionamento elementare, ed evitare così che la composizione del frammento di campione analizzato dall'ICP-MS non rappresenti la reale composizione elementare presente nel campione prima dell'ablazione [255]. Le analisi LA-ICP-MS vengono condotte, solitamente, abbassando la potenza del generatore di radiofrequenza a circa 1300 W, in quanto il campione arriva al plasma già "secco" e non è necessario utilizzare energia per desolvatarlo. Inoltre, per aumentare l'efficienza di trasporto degli ioni attraverso l'interfaccia, generalmente si riduce leggermente la distanza tra la torcia e il cono campionatore rispetto al valore utilizzato quando si lavora con campioni liquidi.

Per ogni campione prelevato dai pazienti ustionati, è stato utilizzato una schema di ablazione a linee (*scan lines*), da sinistra verso destra. Durante l'ablazione sono stati acquisiti in modalità *time resolved analyses* i segnali relativi al rapporto m/z 13, 31, 34, 67, 107 con l'obiettivo di ottenere informazioni sulla distribuzione spaziale rispettivamente del carbonio (C), del fosforo (P), dello zolfo (S), dello zinco (Zn) e dell'argento (Ag). È stato, inoltre, acquisito mediante ICP-MS il segnale relativo al rapporto m/z 109, il secondo isotopo dell'Ag. I risultati relativi alla distribuzione del secondo isotopo dell'Ag non saranno presentati in questo elaborato, ma sono stati utilizzati in fase di elaborazione dei dati per confermare che i due isotopi (^{107}Ag e ^{109}Ag) avessero distribuzioni spaziali identiche. Una diversa distribuzione degli isotopi sarebbe stata indice, infatti, di un problema di frazionamento degli elementi in fase di analisi [256]. I campioni sono stati analizzati utilizzando una risoluzione spaziale variabile, dipendente dal campione e compresa tra 12 μm e 100 μm , lasciando dello spazio tra le linee di ablazione. La velocità di scansione è stata impostata utilizzando le indicazioni fornite da Lear e collaboratori [159]. L'energia del laser e la frequenza di pulsazione sono state ottimizzate giornalmente, con lo scopo di massimizzare l'ablazione dei tessuti cutanei e ridurre al minimo l'ablazione del vetrino da microscopia sottostante. I dati generati dal programma di gestione ed elaborazione

dei segnali acquisiti dall'ICP-MS sono stati convertiti in file .csv e, successivamente, importati in un foglio di calcolo per l'elaborazione. Le mappe di ogni elemento sono state assemblate linea dopo linea. Per ogni linea è stata effettuata una correzione per il rumore di fondo. Il segnale medio del rumore di fondo è stato registrato per 10 secondi prima dell'inizio di ogni linea di ablazione e, quindi, sottratto ad ogni singolo dato puntuale. Questa operazione è stata effettuata per ogni linea di ablazione in quanto il rumore di fondo non è costante ma può variare nel corso della giornata. Le mappe di distribuzione sono state generate utilizzando il programma Surfer11 (Golden Software Inc, Golden, Colorado, USA), ed è stato scelto di presentare le aree a maggiore concentrazione dell'elemento di interesse con colori caldi, mentre le aree che presentano concentrazioni minori sono rappresentate con colori freddi. Le immagini delle sezioni sottili sono state acquisite utilizzando i microscopi e le fotocamere associate a entrambe le unità di ablazione laser. L'ottimizzazione dei parametri strumentali dell'ICP-MS è stata effettuata quotidianamente per massimizzare la sensibilità e ottimizzare la stabilità del segnale. I principali parametri strumentali adottati e le impostazioni dell'unità di ablazione laser sono riportate singolarmente per ogni campione analizzato. È stato scelto di acquisire anche i segnali relativi al carbonio, al fosforo e allo zolfo perchè questi elementi sono presenti in tutti i campioni biologici e permettono di riconoscere i tessuti che costituiscono la sezione in analisi. Ad esempio, attraverso la mappa di distribuzione del carbonio, è possibile distinguere facilmente il tessuto adiposo poichè questo è caratterizzato da un'elevata concentrazione di carbonio dovuta alla presenza di trigliceridi negli adipociti [142]. Diversamente, il fosforo risulta più presente nel derma e nel tessuto muscolare. È stata valutata anche la distribuzione dello zolfo poiché questo elemento presenta un'elevata affinità con l'Ag⁺ e recenti studi hanno indicato che questo elemento è coinvolto nel processo di detossificazione del metallo [29, 249]. Attraverso le mappe di distribuzione dello zolfo, si è provato ad individuare una possibile colocalizzazione dell'argento e dello zolfo nei campioni. Purtroppo queste indagini non hanno portato a risultati interessanti in nessuno dei campioni analizzati: non è stato possibile identificare una colocalizzazione dell'argento e dello zolfo nella pelle, in quanto quest'ultimo elemento sembra essere abbastanza uniformemente distribuito nel derma. Le mappe relative alla distribuzione dello zolfo nei diversi campioni sono presentate ma non saranno discusse ulteriormente.

Considerato il poco tempo strumentale a disposizione, non è stato possibile sviluppare e mettere a punto un metodo per la quantificazione degli elementi d'interesse presenti all'interno dei campioni. In questo lavoro di ricerca è stato scelto di utilizzare il tempo strumentale disponibile per ottenere il maggior numero possibile di mappe di distribuzione. Lo

scopo principale di questa fase del progetto di ricerca era, infatti, studiare i meccanismi di azione delle AgNPs e la loro interazione con i tessuti cutanei. L'attività è stata focalizzata, pertanto, verso l'ottenimento del maggior numero di mappe al fine di valutare l'eventuale variazione spaziale dell'Ag nel corso del processo di guarigione e chiarire in che modo l'argento venga assorbito e distribuito tra i diversi organi e tessuti del corpo umano. Le mappe presentate in questo lavoro di ricerca forniscono, quindi, delle informazioni qualitative sulla distribuzione dell'Ag nei campioni di pelle e i risultati sono riportati come conteggi per secondo (CPS).

Una volta ottenuto un numero sufficiente di sezioni sottili da destinare alle analisi LA-ICP-MS, la parte rimanente di ogni biopsia cutanea è stata tagliata utilizzando un bisturi in sezioni trasversali di circa 1mm di spessore. Le singole sezioni sono state poi mineralizzate con 100 μ L di TMAH per tutta la notte in bagno termostato a 60°C. I campioni sono stati diluiti come descritto nella sezione 7.3 ed analizzati per determinare la concentrazione totale di Ag nella singola sezione. In questo modo è stato possibile presentare per ogni campione la mappa di distribuzione dell'Ag accanto al profilo di concentrazione dell'elemento. Affiancare il profilo di concentrazione dell'Ag alla mappa di distribuzione è utile soprattutto nel caso in cui non siano disponibili materiali certificati necessari per validare i risultati ottenuti e confermare la veridicità delle mappe generate. Inoltre, nel caso specifico di questo studio, è stato scelto di ottimizzare i parametri strumentali dell'unità di ablazione laser direttamente sulla parte più interessante del campione, cioè il derma. Durante l'analisi del tessuto adiposo è stato notato un problema che interessava sia l'ablazione che il trasporto del materiale ablato. In particolare è stato osservato che il materiale non era trasportato efficacemente verso l'ICP-MS ma ricadeva in parte sul campione e sul vetrino da microscopia sottostante. Questo fenomeno poteva determinare una sottostima della reale quantità di Ag presente in questa parte del campione. L'immagine in figura 20 è esemplificativa del fenomeno osservato ed è stata acquisita durante l'analisi di una sezione sottile ottenuta da una biopsia prelevata dal paziente D. Per confermare l'assenza di Ag nel tessuto adiposo, è stato, quindi, deciso di utilizzare il campione rimanente per studiare il profilo di concentrazione dell'Ag.

È necessario ricordare, inoltre, che i campioni analizzati in questo studio sono composti da diversi tessuti e che l'ottenimento di sezioni sottili rappresentative della struttura dell'intero campione può risultare difficoltoso in quanto i diversi tessuti reagiscono in maniera differente all'azione della lama del criomicrotomo. In particolare, è stato notato che nelle sezioni sottili il tessuto adiposo tende a separarsi dal derma.

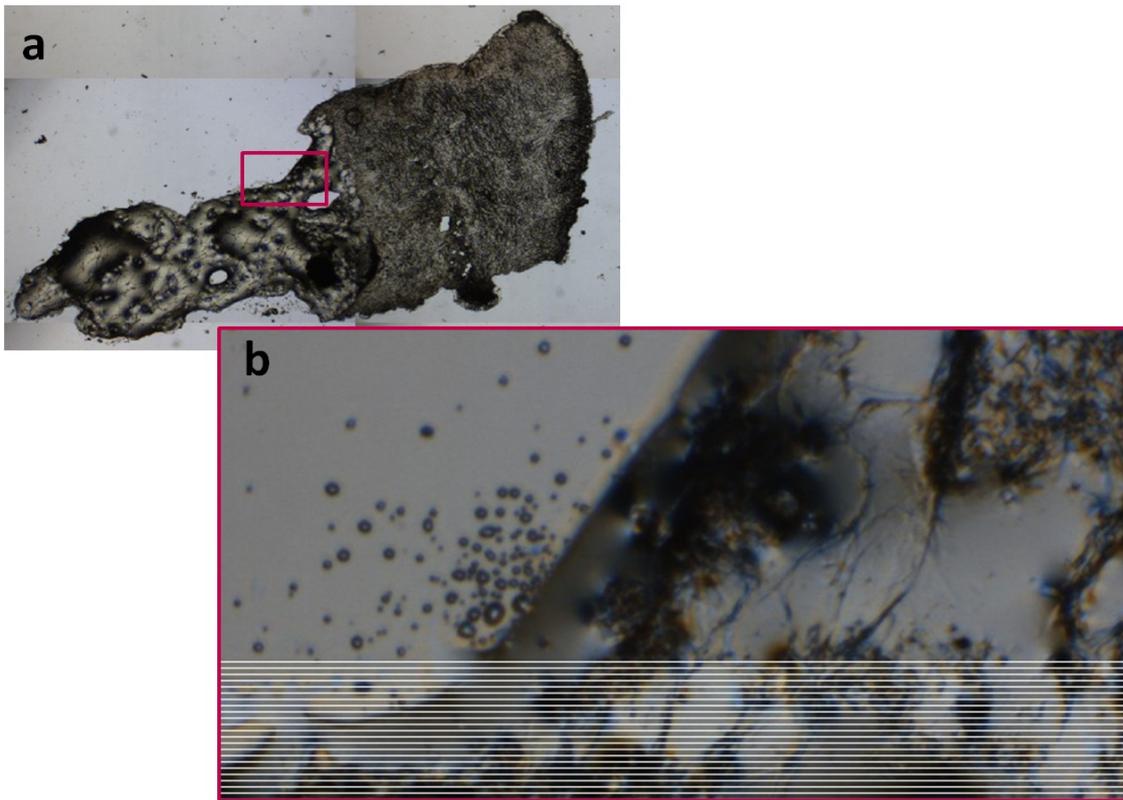


Figura 20: a) Immagine di una sezione sottile ottenuta da una biopsia prelevata dal paziente D. Sono ben riconoscibili il tessuto adiposo (a sinistra) e il derma (a destra). In rosso è riquadrata l'area analizzata. b) Ingrandimento dell'area riquadrata. Nell'immagine si nota lo schema di ablazione a linee parallele e la ricaduta del materiale ablato sul vetrino da microscopia dovuto all'inefficiente trasporto.

In aggiunta, è possibile che le sezioni ottenute vengano danneggiate durante lo spostamento dalla sede di taglio al vetrino da microscopia. In figura 21 si può osservare la differenza tra la forma del campione sul portacampione del criomicrotomo e la forma della sezione sottile ottenuta da quella biopsia. Questa osservazione spiega anche il motivo per cui, in alcuni casi, i profili di concentrazione dell'Ag risultano essere determinati su campioni apparentemente più lunghi rispetto alle sezioni da cui sono state ottenute le mappe.

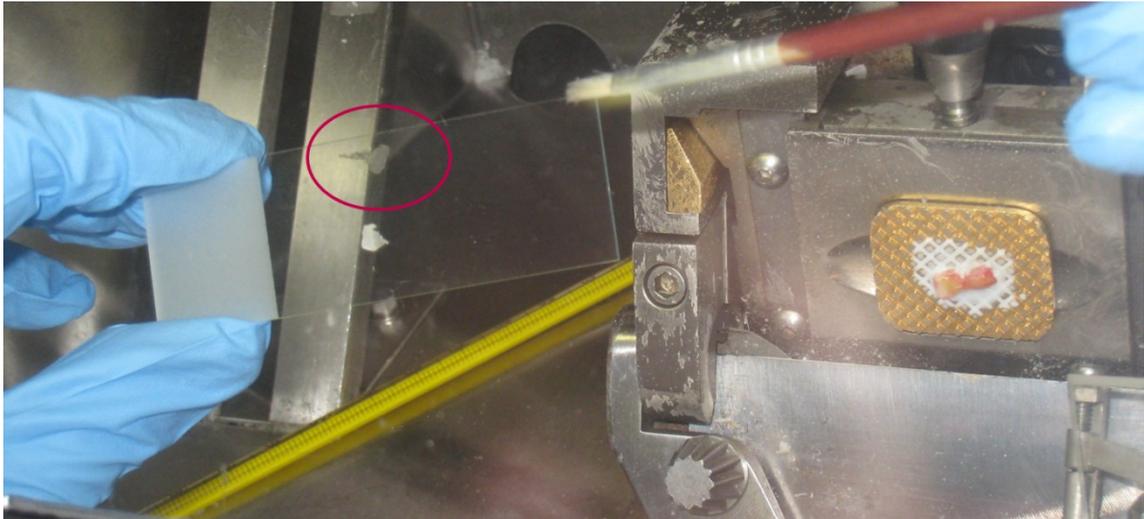


Figura 21: Preparazione delle sezioni sottili al criomicrotomo. Le sezioni generate vengono spostate dal vassoio metallico al vetrino da microscopia utilizzando un pennello. Questa operazione può danneggiare la sezione e comprometterne l'integrità. La presenza di differenti tessuti all'interno del medesimo campione rende difficile ottenere sezioni sottili rappresentative dell'intera struttura dello stesso. Si veda, ad esempio, la forma del campione presente sul portacampione e la forma della sezione sottile ottenuta dallo stesso e riquadrata in rosso.

7.4.2 VALUTAZIONI SULLA QUALITA' DEL DATO E SULLA RIPRODUCIBILITA' DELLA MISURA

Prima di iniziare le analisi sulle sezioni sottili di pelle, è stata valutata la riproducibilità della misura dei CPS. A tale scopo è stata utilizzata una sezione ottenuta dal campione prelevato dal paziente C dopo 5 giorni di trattamento. All'interno della sezione, è stata identificata un'area di dimensioni relativamente grandi, priva di discontinuità o zone sovrapposte, e che non comprendesse tessuti diversi. La presenza di un unico tessuto è fondamentale in quanto all'interno di un tessuto la distribuzione dei principali elementi costituenti quali carbonio, fosforo e zolfo è molto omogenea. Pertanto l'area si presenta come un campione ideale per effettuare valutazioni sulla riproducibilità della misura dei segnali relativi ai rapporti m/z 13, 31 e 34. Purtroppo non è stato possibile verificare la riproducibilità della misura dei segnali dei rapporti m/z 107 e 109 in quanto l'Ag non è uniformemente distribuito all'interno del campione. L'area con le caratteristiche richieste è stata identificata nella porzione più superficiale del derma. Sono stati disegnati degli schemi di ablazione a linee orizzontali parallele utilizzando un'area di campionamento di $20\ \mu\text{m}$ e lasciando $10\ \mu\text{m}$ di spazio tra le diverse linee di scansione. Per ogni linea di ablazione è stato ottenuto un segnale proporzionale alla concentrazione dell'elemento di interesse nell'area campionata in funzione del tempo. Il segnale è stato acquisito per almeno 30 secondi, e per ogni sessione di misura sono state tracciate almeno 5 linee parallele di identica lunghezza. In fase di elaborazione dei dati, è stata

integrata l'area sottesa da ogni grafico ed è stata calcolata la media delle aree e le deviazioni standard relative percentuali (RSD%) su 5 linee. I parametri strumentali dell'unità di ablazione laser quali energia e frequenza del laser, la percentuale di elio rispetto all'argon e il flusso del gas di trasporto sono stati ottimizzati con lo scopo di massimizzare la quantità di campione ablato, minimizzare l'ablazione del vetro sottostante e rendere il più efficace possibile il trasporto delle particelle generate. Per ogni nuova impostazione dei parametri strumentali, sono stati acquisiti su 5 linee parallele e idetiche tra loro i segnali dei rapporti m/z 13, 31 e 34 ed è stata calcolata la media e RSD%. Le prove effettuate impostando i parametri strumentali utilizzati durante la mappatura dei campioni prelevati dai pazienti B, C e D la RSD% è sempre stata inferiore al 3% per i segnali dei rapporti m/z 13, 31 e 34. Inoltre, per tutte le combinazioni dei parametri strumentali provate nel corso delle diverse verifiche, la RSD% non è mai stata superiore al 5%. I valori riscontrati sono in linea con quanto riportato in letteratura, in particolare nel lavoro di Urgast e collaboratori [152].

7.4.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

In questa parte del lavoro di ricerca sono riportati i risultati relativi agli studi condotti mediante LA-ICP-MS e finalizzati a chiarire la distribuzione dell'Ag nei campioni di pelle prelevati dai pazienti B, C e D trattati con Acticoat™ Flex3. I campioni sono stati prelevati in tempi diversi, nel corso del processo di guarigione delle lesioni e contestualmente al cambio delle medicazioni.

7.4.3.1 Paziente B

In figura 22 è riportata la distribuzione dell'Ag nei quattro campioni prelevati dal paziente B. I parametri strumentali applicati all'unità di ablazione laser e all'ICP-MS per l'analisi di questi campioni sono riportati in tabella 10.

Le immagini sono state ottenute utilizzando un'area di campionamento pari a 55 µm, mentre lo spazio lasciato tra una linea di ablazione e l'altra era pari a 50 µm. Ne risulta che la risoluzione complessiva delle immagini è di 105 µm. In ogni immagine i campioni sono presentati con la stessa orientazione e la direzione della scansione è indicata da una freccia. Nella prima linea sono presentate le mappe di distribuzione del carbonio (¹³C), del fosforo (³¹P), dello zolfo (³⁴S), dello zinco (⁶⁷Zn) e dell'argento (¹⁰⁷Ag) prima dell'applicazione della medicazione e una foto del campione acquisita durante la fase di preparazione al criomicrotomo. Come atteso, prima dell'applicazione dell'Acticoat™ Flex3 nel campione di

pelle non è presente Ag. Il profilo di concentrazione dell'Ag relativo a questa biopsia conferma il risultato.

Area di campionamento	55µm
Velocità di scansione	50 µm·s ⁻¹
Frequenza	10Hz
Energia del laser	35%
Fluence	0.1 J·cm ⁻²
Spazio tra le linee di ablazione	50 µm
Potenza generatore di radiofrequenza	1360W
Flusso del plasma gas	15 L·min ⁻¹
Flusso del gas di trasporto	1.45 L·min ⁻¹
Impostazioni lenti ioniche	Ottimizzate giornalmente per ottenere il massimo della sensibilità e ottimizzare il rapporto $^{232}\text{Th}^{16}\text{O}^+ / ^{232}\text{Th}^+$ al valore unitario usando il materiale certificato NIST612
Masse monitorate	^{13}C , ^{31}P , ^{34}S , ^{67}Zn , ^{107}Ag , ^{109}Ag
Tempo di acquisizione per massa	0.02 s per m/z 13; 0.05 s per m/z 31 e 34; 0.15 s per m/z 67; 0.1 s per m/z 107 e 109

Tabella 10: Parametri strumentali applicati al sistema di introduzione del campione ad ablazione laser e allo strumento ICP-MS durante le analisi delle sezioni sottili ottenute dalle biopsie prelevate dal paziente B.

Diversamente, poichè il tessuto dermico è pesantemente infiammato, è presente molto Zn. Durante la fase infiammatoria, infatti, vengono richiamate presso il tessuto cellule del sistema immunitario chiamate mastociti. Queste cellule hanno al loro interno elevate quantità di zinco. Inoltre, l'accumulo di Zn nel tessuto è legato anche al rilascio di MMPs nel sito della lesione. Come è già stato illustrato precedentemente, le MMPs sono endopeptidasi zinco dipendenti in grado di degradare tutti i costituenti della matrice extracellulare e sono coinvolte nelle prime fasi del processo di guarigione delle ferite. Le mappe di distribuzione del carbonio (m/z 13), del fosforo (m/z 31) e dello zolfo (m/z 34) sono state acquisite per distinguere la struttura anatomica dei campioni, per fornire informazioni relative alla posizione dei tessuti presenti nel campione e per evidenziare la presenza di irregolarità nel campione, quali, ad esempio, rotture e discontinuità delle sezioni.

Paziente B

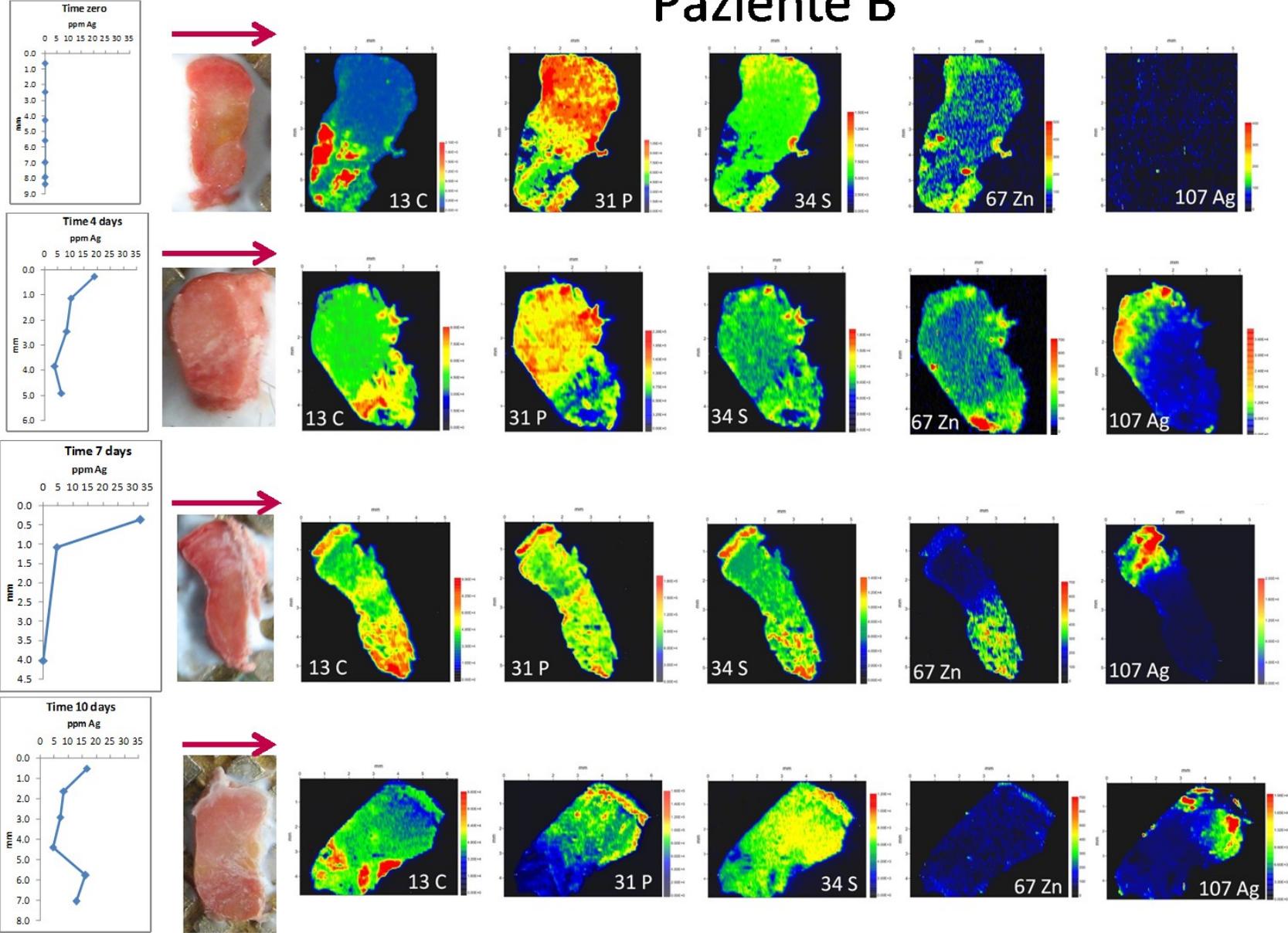


Figura 22: Mappe di distribuzione del carbonio (13 C), del fosforo (31 P), dello zolfo (34 S), dello zinco (67 Zn) e dell'argento (107 Ag) nelle biopsie cutanee ottenute dal paziente B. I campioni sono stati prelevati prima dell'applicazione dell'Acticoat™ Flex 3 (prima linea), dopo 4 giorni di trattamento con una applicazione di medicazione (seconda linea), e dopo due applicazioni dell'Acticoat™ Flex 3 e 7 giorni di trattamento (terza linea). Nell'ultima linea sono riportate le mappe di distribuzione ottenute dal campione prelevato dopo 10 giorni di trattamento e tre applicazioni di medicazione contenente AgNPs. Sono riportati anche i profili di concentrazione dell'Ag dei medesimi campioni e le fotografie degli stessi, acquisite durante la preparazione delle sezioni sottili. La freccia indica la direzione della scansione.

In ogni campione è stato notato che il fosforo e lo zolfo sono più presenti nel derma, mentre nel tessuto adiposo il carbonio è presente in maggiori quantità, come già osservato da Urgast e collaboratori [142].

Già dopo la prima applicazione della medicazione contenente AgNPs è possibile osservare la presenza dell'Ag prevalentemente nella parte superiore del derma. Le immagini sono riportate nella seconda linea della figura 22 e la comparsa dell'Ag nel campione è stata confermata attraverso il profilo di concentrazione dell'Ag. Poiché la prima applicazione dell' Acticoat™ Flex3 è durata solo 4 giorni, la fase infiammatoria non si è conclusa ma è ancora in corso. Questo spiega perché il tessuto sia ancora caratterizzato da un'elevata presenza di Zn.

Nella terza linea dell'immagine in figura 22, è possibile verificare come, dopo 7 giorni di trattamento e due applicazioni di Acticoat™ Flex3, l'area contenente l'Ag e la quantità del metallo nel campione siano aumentate. Questo suggerisce che durante la prima parte del trattamento, i siti di legame per l'Ag presenti nel tessuto non siano stati ancora saturati. Questa osservazione è in linea con quanto riportato da Rigo e collaboratori [72]. Dalle immagini si nota anche che l'Ag si localizza prevalentemente nella parte superiore del derma. E' interessante osservare come in questo campione lo Zn si localizzi nella parte opposta del campione rispetto all'Ag. Questo fenomeno suggerisce che l'Ag è in grado di ridurre l'infiammazione e promuovere il processo di guarigione della ferita, in accordo con i risultati presentati separatamente da Kirsner [68] e Widgerow [69].

Nei successivi tre giorni di trattamento con l'ultima applicazione di Acticoat™ Flex 3, la ferita guarisce e si assiste alla formazione della nuova epidermide, che determina la chiusura della lesione. La guarigione della lesione, comporta una riduzione nella quantità di Zn presente nei tessuti e una ridistribuzione omogenea di questo elemento in tutto il campione analizzato. Diversamente, dopo 10 giorni di trattamento, la distribuzione dell'Ag è fortemente disomogenea. Nel campione sono presenti a livello del derma e della sua sommità delle aree

contenenti elevate concentrazioni di Ag. In mezzo a queste aree, c'è, invece, una porzione di campione completamente priva di Ag. Al fine di chiarire le ragioni di questa distribuzione anomala, è stato deciso di analizzare una porzione molto piccola di campione con una risoluzione spaziale molto alta, utilizzando un'altra sezione sottile proveniente dallo stesso campione. I parametri strumentali applicati all'unità di ablazione laser e all'ICP-MS per l'analisi di questa sezione sottile sono riportati in tabella 11.

Area di campionamento	6 μm
Velocità di scansione	5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
Frequenza	10Hz
Energia del laser	45%
Fluence	0.1 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$
Spazio tra le linee di ablazione	6 μm
Potenza generatore di radiofrequenza	1360W
Flusso del plasma gas	15 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Flusso del gas di trasporto	1.45 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Impostazioni lenti ioniche	Ottimizzate giornalmente per ottenere il massimo della sensibilità e ottimizzare il rapporto $^{232}\text{Th}^{16}\text{O}^+ / ^{232}\text{Th}^+$ al valore unitario usando il materiale certificato NIST612
Masse monitorate	^{13}C , ^{31}P , ^{34}S , ^{67}Zn , ^{107}Ag , ^{109}Ag
Tempo di acquisizione per massa	0.05 s per m/z 13, 31 e 34; 0.2 s per m/z 67, 107 e 109

Tabella 11: Parametri strumentali applicati al sistema di introduzione del campione ad ablazione laser e allo strumento ICP-MS durante le analisi ad alta risoluzione della sezione sottile ottenuta dalle biopsie prelevate al decimo giorno di trattamento dal paziente B.

In figura 23 sono riportate le mappe di distribuzione del P e dell'Ag relative all'area analizzata: le mappe sono state ottenute con una risoluzione pari a 12 μm (area di campionamento di 6 μm , e spazio tra le linee pari a 6 μm). Considerando la posizione e l'elevato contenuto di fosforo nell'area priva di Ag, si evince che questa parte del campione corrisponde alle nuova epidermide. I risultati sembrano pertanto indicare che durante le prime applicazioni di Acticoat™ Flex 3 l'Ag viene rilasciato direttamente all'interno del derma. Successivamente, in seguito alla chiusura della ferita da parte della nuova epidermide, l'Ag non riesce a raggiungere il tessuto dermico in quanto non è in grado di attraversare la barriera naturale costituita dall'epidermide. Questa ipotesi è in linea con quanto riportato da Labouta e collaboratori [257] e supporta i risultati ottenuti mediante analisi al TEM della biopsia cutanea prelevata dall'area guarita del paziente A.

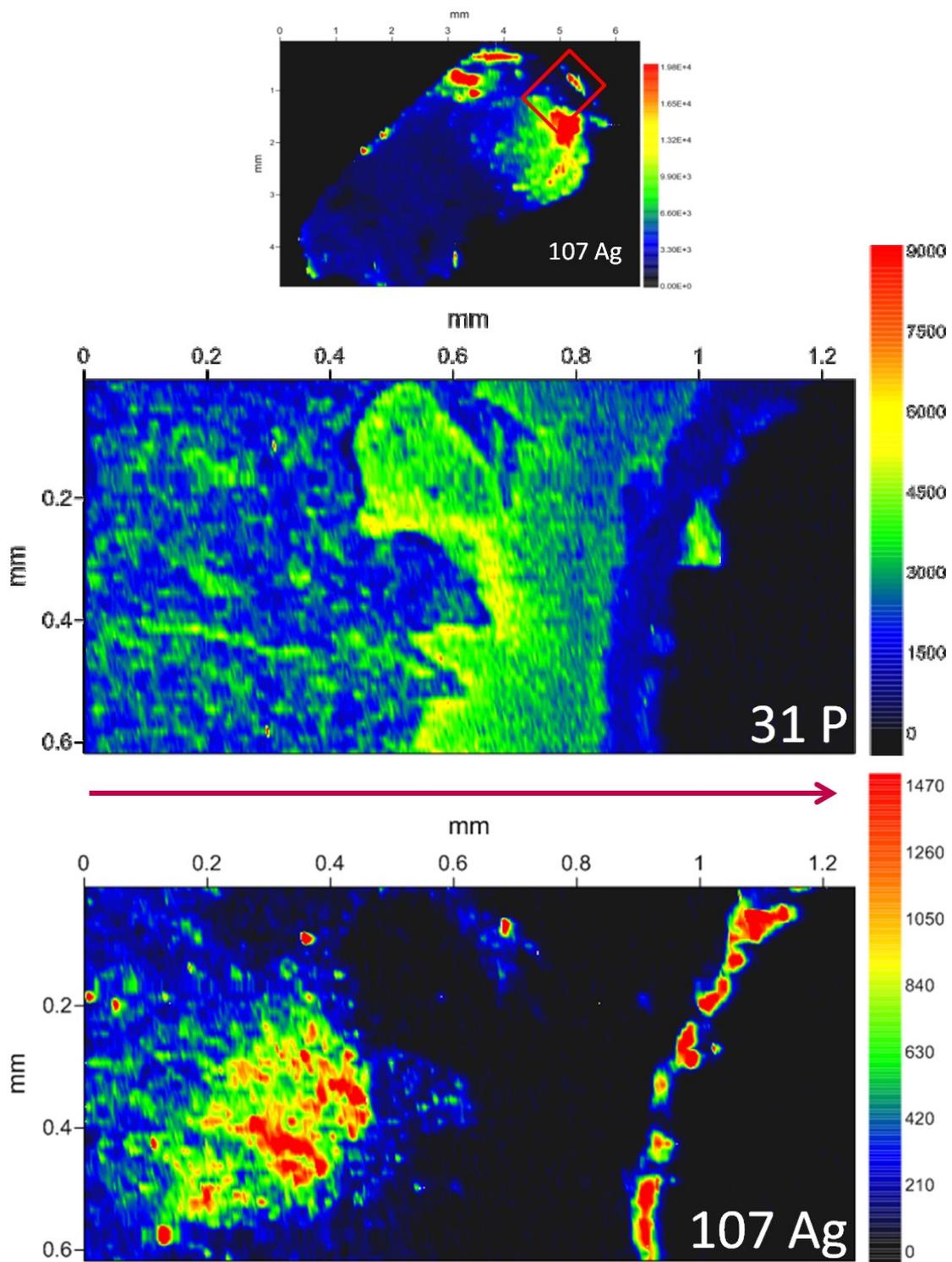


Figura 23: Mappe di distribuzione dell'Ag e del P ottenute con risoluzione pari a $12\mu\text{m}$ e reattive al campione prelevato dopo 10 giorni di trattamento. La zona analizzata corrisponde all'epidermide e alla parte superiore del derma. La zona oggetto dell'analisi è riquadrata in rosso nella mappa di distribuzione dell'Ag presente nella parte alta dell'immagine. La freccia indica la direzione della scansione.

Inoltre, è stato dimostrato recentemente che le AgNPs sono in grado di essere assorbite dagli innesti di pelle prelevati da cadaveri ma questo dipende dal metodo di conservazione del lembo di cute [258], e dalla presenza di danni o di lesioni su questa [259, 260]. Sulla sommità della cute, è però ancora applicato il terzo pezzo di Acticoat™ Flex 3.

L'Ag presente in questa medicazione viene trasferito dal prodotto alla cute e si deposita sulla superficie della pelle. L'Ag visibile sulla sommità del campione è probabilmente stato rilasciato nel corso della terza e ultima applicazione di Acticoat™ Flex 3, mentre l'Ag individuato nel derma è stato probabilmente rilasciato durante le prime due applicazioni del prodotto. L'Ag presente sulla superficie dell'epidermide sarà probabilmente eliminato in tempi molto rapidi, in quanto questo tessuto è caratterizzato da una rapida sostituzione degli strati più superficiali. Di contro, l'Ag osservato nel derma difficilmente verrà eliminato in tempi rapidi in quanto questo tessuto presenta tempi di rinnovamento e sostituzione (*turn over*) molto lunghi [248]. Poichè è stato dimostrato in più occasioni che l'Ag non è in grado di passare attraverso l'epidermide integra, si suggerisce di sospendere il trattamento con Acticoat™ Flex 3 o altre medicazioni contenenti Ag una volta che la lesione si è riepitelizzata. L'Ag rilasciato, infatti, svolgerebbe un'azione antibatterica topica e localizzata solo sulla epidermide, senza però riuscire a raggiungere il derma. Questa linea guida è importante soprattutto in un'ottica di miglioramento delle cure e di riduzione e contenimento dei costi dei trattamenti.

E' stato osservato, inoltre, che in alcuni dei campioni analizzati, l'Ag è presente anche sui bordi delle sezioni. La presenza dell'Ag in questa parte del campione è spiegabile se si considera che le biopsie vengono prelevate utilizzando un *punch* ed è quindi probabile che l'Ag venga spinto dalla superficie della pelle lungo i bordi del campione durante le fasi di prelievo. Per questa ragione i bordi del campione non dovrebbero essere considerati rappresentativi durante gli studi relativi alla distribuzione dell'Ag nella pelle.

Nella parte terminale di alcune delle sezioni analizzate sono state osservate delle aree contenenti Ag. Osservando le mappe di distribuzione dei vari elementi non è possibile determinare con certezza il tipo di tessuto presente. Considerata la posizione, potrebbe trattarsi di tessuto muscolare o di una di piccolo un vaso sanguigno. La presenza di Ag nelle pareti dei vasi è stata dimostrata attraverso le analisi dei campioni prelevati dal paziente D (si veda la sezione 7.4.3.3), mentre la presenza di Ag nel tessuto muscolare è stata recentemente dimostrata in un lavoro condotto su topi ai quali erano state somministrate AgNPs e argento acetato per via orale [261]. La presenza dell'Ag nei muscoli non dovrebbe stupire in quanto i pazienti trattati con medicazioni contenenti Ag presentano elevate concentrazione di Ag nel

sangue [14, 213, 262] e i muscoli sono composti da tessuti altamente vascolarizzati necessari a garantire un sufficiente apporto di ossigeno, che viene utilizzato nella respirazione cellulare. I profili di concentrazione dell'Ag confermano la presenza del metallo nella parte terminale di alcuni campioni, escludendo così l'ipotesi di contaminazioni accidentali durante la preparazione delle sezioni sottili, o durante l'analisi LA-ICP-MS.

7.4.3.2 Paziente C

Il paziente C è arrivato al Centro Ustioni di Padova dopo un breve ricovero presso un'altra struttura minore, dove è stato trattato con una crema contenente argento sulfadiazina. In figura 24 sono presentate le mappe di distribuzione dell'Ag nelle sezioni sottili ottenute dalle biopsie prelevate dal Paziente C.

Area di campionamento	20µm
Velocità di scansione	22.78 µm·s ⁻¹
Frequenza	10Hz
Energia del laser	10%
Fluence	1 J·cm ⁻²
Spazio tra le linee di ablazione	8 µm
Flusso He1 e He2	500 mL·min ⁻¹ ; 300 mL·min ⁻¹
Potenza generatore di radiofrequenza	1350W
Flusso del plasma gas	15 L·min ⁻¹
Flusso del gas di trasporto	0.75 L·min ⁻¹
Impostazioni lenti ioniche	Ottimizzate giornalmente per ottenere il massimo della sensibilità e ottimizzare il rapporto ²³² Th ¹⁶ O ⁺ / ²³² Th ⁺ al valore unitario usando il materiale certificato NIST612
Masse monitorate	¹³ C, ³¹ P, ³⁴ S, ⁶⁷ Zn, ¹⁰⁷ Ag, ¹⁰⁹ Ag
Tempo di acquisizione per massa	0.1 s per m/z 13, 31 e 34; 0.2 s per m/z 67, 107 e 109

Tabella 12: Parametri strumentali applicati al sistema di introduzione del campione ad ablazione laser e allo strumento ICP-MS durante le analisi delle sezioni sottili ottenute dalle biopsie prelevate dal Paziente C.

Nella prima riga è possibile osservare le mappe di distribuzione carbonio (¹³C), del fosforo (³¹P), dello zolfo (³⁴S), dello zinco (⁶⁷Zn) e dell'argento (¹⁰⁷Ag) nel campione prelevato prima dell'applicazione dell' Acticoat™ Flex3. Le immagini sono state ottenute utilizzando una risoluzione spaziale di 28 µm (area di campionamento di 20 µm, e spazio tra le linee pari a 8 µm). In tabella 12 sono riportati i parametri strumentali applicati all'unità di ablazione laser e all'ICP-MS durante l'analisi delle sezioni sottili ottenute dal paziente C. In figura 25 è riportata una fotografia della sezione sottile ottenuta dal campione prelevato prima dell'applicazione della medicazione contenente AgNPs. L'immagine è stata acquisita immediatamente prima

delle analisi di LA-ICP-MS. Nella parte alta della sezione è ben visibile l'escara. L'escara è una porzione di tessuto andata incontro a fenomeni necrotici, tipica delle ustioni, e ben delimitata dal tessuto sano circostante. Una volta terminato il processo di guarigione, l'escara viene sostituita da tessuto cicatriziale.

Paziente C

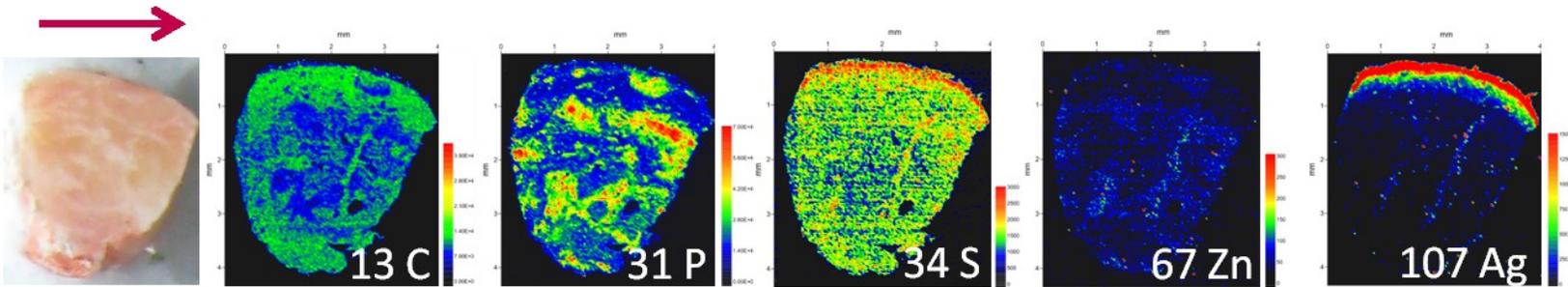
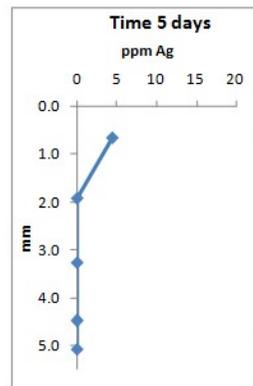
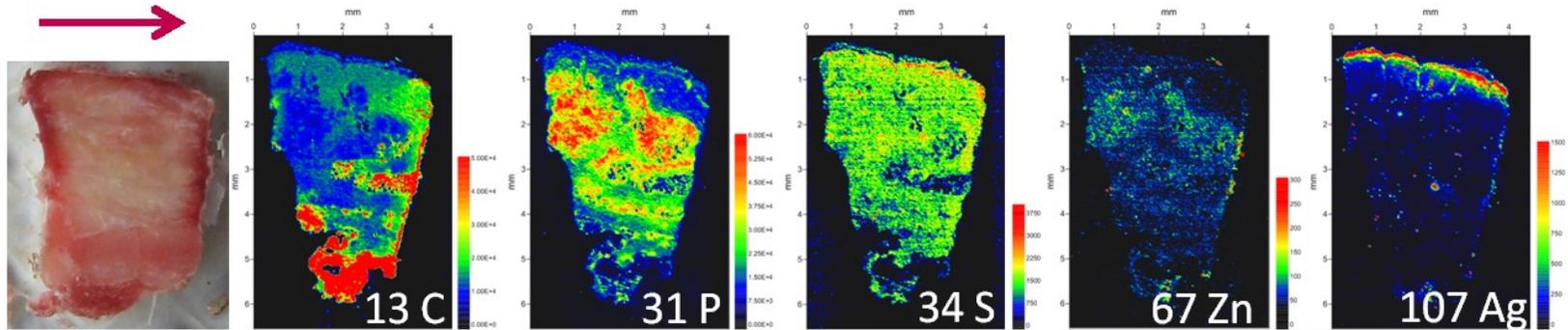
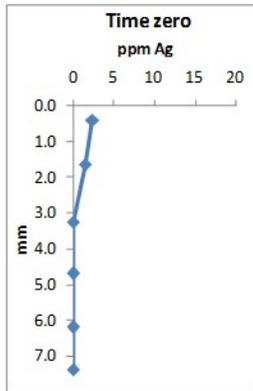


Figura 24: Mappe di distribuzione del carbonio (13 C), del fosforo (31 P), dello zolfo (34 S), dello zinco (67 Zn) e dell'argento (107 Ag) nelle biopsie cutanee ottenute dal paziente C. I campioni sono stati prelevati prima dell'applicazione dell'Acticoat™ Flex 3 (prima linea), e dopo 5 giorni di trattamento con una applicazione di medicazione (seconda linea). Sono riportati i profili di concentrazione dell'Ag dei medesimi campioni e le fotografie degli stessi, acquisite durante la preparazione delle sezioni sottili. La freccia indica la direzione della scansione.

Nel campione prelevato prima dell'applicazione dell'Acticoat™ Flex3 e presentato nella prima linea della figura 24, è possibile osservare la presenza di Ag nella parte superiore del derma e all'interno dell'escara. La presenza di Ag nel campione è confermata anche dal profilo di concentrazione del metallo.



Figura 25: Immagine della sezione sottile prima delle analisi di LA-ICP-MS. La sezione sottile è stata ottenuta dal campione prelevato dal paziente C prima della pulizia chirurgica dell'ustione e prima dell'applicazione della medicazione contenente AgNPs. Nella parte superiore della sezione è ben visibile l'escara.

E' interessante notare come l'Ag, in forma di Ag^+ o di argento coniugato alla sulfadiazina, sia in grado di penetrare attraverso l'escara. Questo dato è in accordo con quanto riportato da Moghimi e collaboratori [263]. Il secondo campione è stato prelevato dopo la rimozione chirurgica dell'escara e l'applicazione di un singolo pezzo di Acticoat™ Flex3 per 5 giorni. Il confronto tra le mappe di distribuzione dell'Ag e i profili di concentrazione prima e dopo l'applicazione dell' Acticoat™ Flex3, dimostrano che dopo la prima applicazione della medicazione, la quantità dell'Ag aumenta nel derma. Questo dato supporta quanto già

ipotizzato durante le analisi dei campioni prelevati dal paziente B, ovvero che durante il trattamento non siano stati saturati tutti i siti di legame per l'Ag e che questo continui ad accumularsi nel derma nonostante la presenza del metallo all'interno del tessuto.

L'analisi delle sezioni sottili ottenute dai campioni prelevati dal paziente C confermano l'alterazione della distribuzione dello Zn e la riduzione della sua concentrazione nel derma. In questo caso però la riduzione appare meno marcata in quanto, probabilmente, il pretrattamento con argento sulfadiazina ha parzialmente ridotto l'infiammazione già prima dell'applicazione dell'Acticoat™ Flex3.

7.4.3.3 Paziente D

Il paziente D era affetto da un'ustione a tutto spessore da fiamma localizzata nel torace. I campioni sono stati prelevati dalla zona ascellare prima dell'applicazione dell'Acticoat™ Flex 3, e dopo la prima applicazione (7 giorni di trattamento). L'ultimo campione è stato prelevato dopo la seconda applicazione della medicazione, due settimane dopo l'inizio delle cure. L'evoluzione della distribuzione dell'Ag durante il processo di guarigione e i profili di concentrazione del metallo sono presentati in figura 26. Come nello studio dei campioni prelevati dal Paziente C, le immagini sono state acquisite utilizzando una risoluzione spaziale di 28 μm (area di campionamento di 20 μm , e spazio tra le linee pari a 8 μm). I parametri strumentali applicati all'unità di ablazione laser e all'ICP-MS per l'analisi di queste sezioni sono gli stessi utilizzati per analizzare i campioni prelevati dal paziente C e sono riportati in tabella 12. Il primo campione è stato prelevato dopo la pulizia chirurgica della ferita e prima dell'applicazione della medicazione contenente AgNPs, pertanto, come atteso, nella sezione sottile analizzata non è presente Ag. Anche nel caso del campione prelevato dal paziente D è stato osservato un accumulo di Zn nel derma dovuto all'infiammazione del tessuto. In questo campione il riconoscimento del tessuto adiposo è estremamente facile e immediato, a causa dell'elevato contenuto di carbonio che caratterizza questa porzione del campione. Diversamente, il derma è caratterizzato da un maggiore contenuto relativo di fosforo. È interessante notare come nel secondo e nel terzo campione analizzati, sia presente un grosso quantitativo di Ag nel derma mentre nel tessuto adiposo sottostante, non sia stato possibile individuare la presenza del metallo. Durante la preparazione delle sezioni sottili, è stato osservata una macchia scura nella parte centrale del derma nel campione prelevato dopo 15 giorni di trattamento.

Paziente D

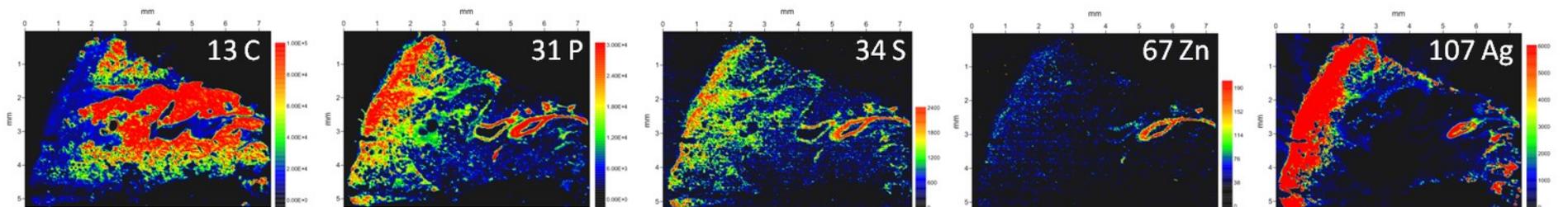
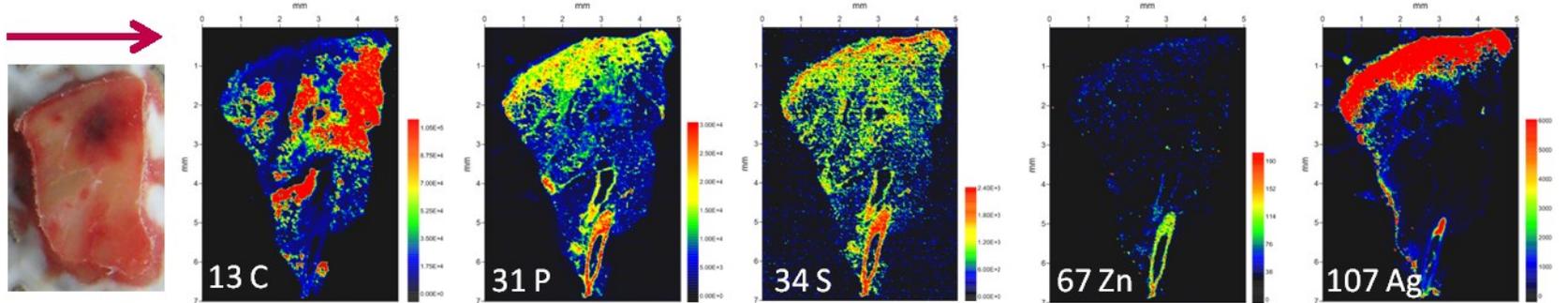
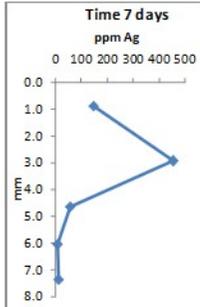
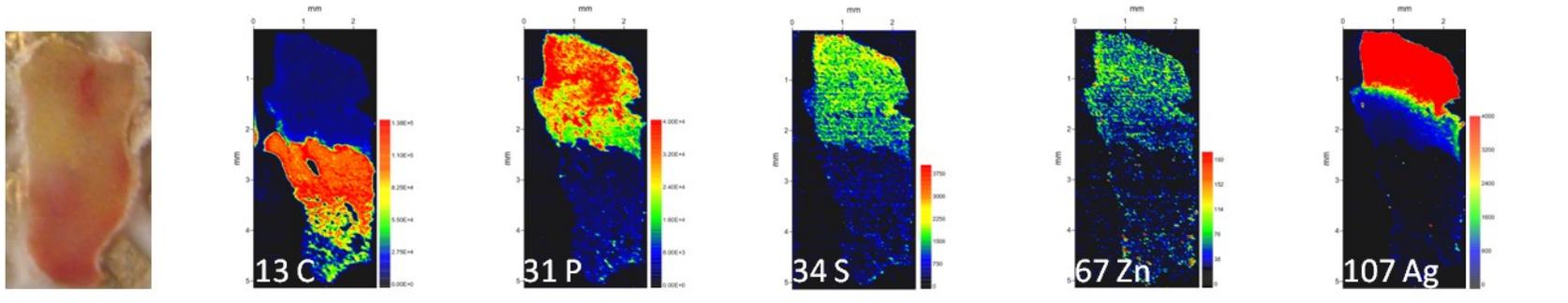
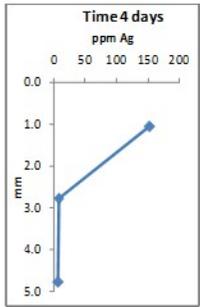
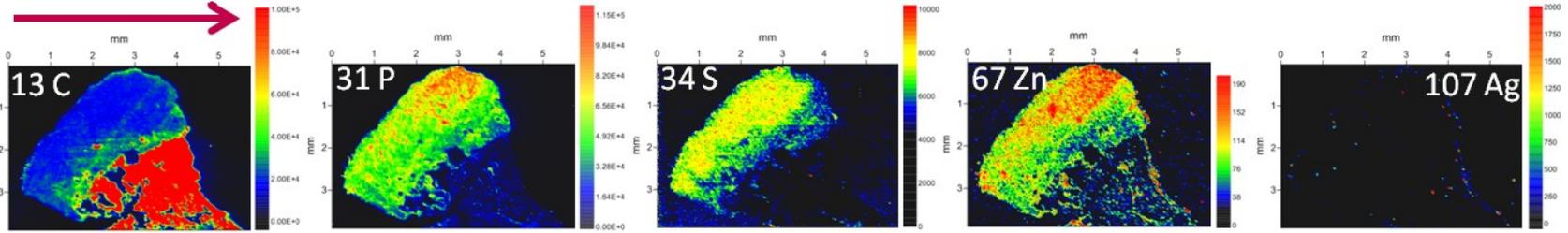
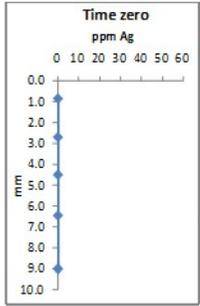


Figura 26: Mappe di distribuzione del carbonio (13 C), del fosforo (31 P), dello zolfo (34 S), dello zinco (67 Zn) e dell'argento (107 Ag) nelle biopsie cutanee ottenute dal paziente D. I campioni sono stati prelevati prima dell'applicazione dell'Acticoat™ Flex 3 (prima linea), dopo 7 giorni di trattamento con una applicazione di medicazione (seconda linea), e dopo due applicazioni dell'Acticoat™ Flex 3 e 15 giorni di trattamento (terza e quarta linea). Sono riportati anche i profili di concentrazione dell'Ag dei medesimi campioni e le fotografie degli stessi, acquisite durante la preparazione delle sezioni sottili. Nel campione prelevato dopo 15 giorni di trattamento è stato osservato un frammento proveniente dal rivestimento di Ag metallico della medicazione utilizzata. Il frammento appare come una macchia scura al centro del derma ed è visibile nella fotografia del campione. La presenza del frammento nel derma è confermata dal profilo di concentrazione dell'Ag: la concentrazione di Ag nella sezione trasversale corrispondente alla porzione di tessuto contenente il frammento è molto più elevata rispetto a quanto atteso. Le frecce indicano la direzione della scansione. Tutte le sezioni analizzate sono state scansionate da sinistra verso destra.

Inizialmente è stato ipotizzato che si trattasse di un coagulo di sangue, ma in seguito alla mineralizzazione della sezione trasversale relativa al quella porzione di campione, è emerso che si trattava di un grosso quantitativo di Ag. L'ipotesi è che si tratti di un frammento del rivestimento di Ag della medicazione Acticoat™ Flex3, in quanto attraverso gli esperimenti di rilascio in sostituto sierico era stato dimostrato che frammenti del rivestimento metallico si staccavano dalla medicazione. E' interessante osservare che, nonostante la presenza di un consistente quantitativo di Ag, i fibroblasti sono riusciti a replicarsi e rigenerare il tessuto dermico. Il profilo di concentrazione dell'Ag dimostra che in quella porzione di campione la concentrazione di Ag è pari a circa $500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (si veda il profilo di concentrazione riportato nella terza linea della figura 26). Purtroppo non è stato possibile individuare il frammento di Ag nelle mappe di distribuzione dell'elemento, in quanto, per gli studi di distribuzione, sono state utilizzate sezioni sottili generate dalla parte opposta del campione rispetto al punto in cui è stato trovato il frammento.

Nel campione prelevato dopo 15 giorni di trattamento, è stata osservata, immediatamente sotto il tessuto adiposo, una struttura circolare contenente Ag. La struttura è caratterizzata da un elevato contenuto di fosforo, zolfo e zinco, mentre il contenuto di carbonio è ridotto. Considerate la composizione elementare, la posizione, e l'anatomia, la struttura circolare è stata identificata essere un vaso sanguigno. La struttura anatomica dei vasi sanguigni comprende una parte in muscolatura liscia, e questo spiega l'elevato contenuto di fosforo e di zinco. Come già osservato in due diversi lavori di Urgast e collaboratori [127, 142], il fosforo è presente in elevate quantità nei muscoli, mentre lo zinco è naturalmente presente nei vasi sanguigni. E' stato dimostrato che lo zinco protegge le vene e i capillari dai danni causati dallo

stress ossidativo e agisce come stabilizzatore delle pareti dei vasi. In particolare, lo zinco sembra proteggere l'endotelio vascolare dai danni provocati da molecole capaci di alterare la struttura della parete del vaso, quali ad esempio particolari lipidi e citochine coinvolte nel processo infiammatorio [252, 253]. Al fine di verificare questo risultato, è stato deciso di analizzare una seconda sezione sottile proveniente dallo stesso campione. I risultati sono riportati nell'ultima riga della figura 26. L'analisi di questa ulteriore sezione ha confermato l'assenza di Ag nel tessuto adiposo e la presenza del metallo nelle pareti del vaso sanguigno. I risultati sembrano indicare che l'Ag venga rilasciato direttamente nel derma durante le applicazioni della medicazione contenente AgNPs, ma che non sia in grado di attraversare il tessuto adiposo. Questo fenomeno si può spiegare se si considera che il tessuto adiposo è una barriera naturale, il cui compito è proteggere ed isolare gli organi interni dall'ambiente esterno. Inoltre l'Ag, sia in forma di Ag^+ che in forma di AgNPs, presenta cariche nette e positive. È stato dimostrato in più occasioni, infatti, che le AgNPs sono caratterizzate da uno strato esterno ossidato e carico positivamente [197, 264]. Il tessuto adiposo è composto da adipociti, cellule deputate alla sintesi, all'accumulo e al rilascio dei lipidi. Queste cellule sono caratterizzate dalla presenza di depositi di trigliceridi ed esteri del colesterolo all'interno del citoplasma [265]. La presenza di questi depositi di molecole apolari rende difficile l'interazione chimica tra le specie cariche dell'Ag. Risultati simili sono stati ottenuti di recente, in uno studio finalizzato a comprendere la distribuzione delle nanoparticelle d'oro (AuNPs) di forma sferica nei diversi organi e tessuti [266]. In questo lavoro, le AuNPs sono state somministrate ad alcuni topi attraverso iniezione intraperitoneale. Dopo alcune ore dalla somministrazione, i topi sono stati uccisi e sono state eseguite analisi di LA-ICP-MS su campioni di cervello, milza, cuore, reni e tessuto adiposo addominale. I risultati hanno dimostrato l'assenza delle nanoparticelle nel tessuto adiposo addominale.

Nel passato è stato però dimostrato che l' Ag^+ e le AgNPs sono in grado di attraversare le pareti dei vasi sanguigni ed entrare nel circolo sanguigno [25]. È, quindi, probabile che l'Ag rilasciato nel derma, entri nei piccoli vasi e nei capillari presenti in questo tessuto e che venga trasportato dal circolo sanguigno ai diversi organi del corpo umano. Il meccanismo proposto in questo lavoro di ricerca spiega l'origine dell'accumulo di Ag osservato negli organi degli animali utilizzati negli esperimenti *in vivo* [25, 267], nel sangue [14, 213, 268] e negli organi dei pazienti trattati [23, 24, 201].

Come già osservato nei campioni prelevati da i pazienti C e D, la distribuzione dello Zn cambia durante il trattamento con le medicazioni contenenti AgNPs. In figura 26 è possibile osservare

come con il procedere della guarigione, all'aumentare del numero di applicazioni di medicazioni contenenti AgNPs, si osservi una diminuzione della concentrazione di Zn nel derma.

I risultati riportati in questo lavoro di ricerca indicano che l'Ag possiede non solo proprietà antibatteriche, ma anche antinfiammatorie [269]. I ottenuti sono in accordo con dati presenti in letteratura che indicano che le medicazioni contenenti AgNPs riducono il tempo necessario per la completa riepitelizzazione della lesione e riducono la necessità di ricorrere a trapianti cutanei [192, 270].

7.5 OSSERVAZIONI CLINICHE

I risultati ottenuti all'interno di questo lavoro di ricerca si inseriscono bene nella casistica dei pazienti e dei trattamenti svolti presso il Centro Ustioni di Padova tra Gennaio 2011 e Settembre 2012. In questo intervallo di tempo, 98 pazienti ustionati sono stati trattati con la medicazione Acticoat™ Flex 3. A questi pazienti sono state applicate un numero totale di 102 medicazioni, che corrispondono a 58400 cm² di medicazione e a quasi 48g di Ag puro. La quantità di Acticoat™ Flex 3 utilizzata nel corso del 2011, anno di introduzione della medicazione nel Centro Ustioni, è stata pari a 33000cm². I dati sulla quantità media di Acticoat™ Flex 3 utilizzata per mese nell'anno 2011 sono confrontabili con i dati relativi all'anno 2012. La maggior parte dei pazienti trattati erano di sesso maschile (63 uomini contro 45 donne), e l'età media era pari a 49 anni. Le cause delle ustioni sono state fuoco (55 pazienti), liquidi caldi (23 casi, di cui 3 dovuti a olio bollente), ustioni da contatto (6 pazienti) e ustioni da agente chimico (4 casi). Tre dei pazienti da cui sono state prelevate le biopsie cutanee utilizzate in questo lavoro di ricerca erano in trattamento per ustioni da fiamma (Paziente A, C e D) mentre un paziente era affetto da sguantamento dell'arto inferiore (Paziente B). La superficie media ustionata è stata pari al 23.6% ± 17.1% della superficie corporea totale. Tutti i pazienti hanno raggiunto la completa riepitelizzazione della ferita in seguito al trattamento. Per la maggior parte dei pazienti è stata sufficiente una singola applicazione di Acticoat™ Flex 3, come nel caso del Paziente C, e la quantità media di medicazione applicata ad ogni paziente è stata pari a 602.4 ± 163.5 cm² (quantità minima 200 cm², massima 1100 cm²). La riepitelizzazione è stata spontanea nella maggior parte dei casi (80 su 98) e le lesioni sono guarite entro 32 ± 18 giorni dall'ultima applicazione della medicazione. Il Paziente A ha raggiunto la completa riepitelizzazione in 15 giorni, mentre sono stati necessari

10 giorni per ottenere la completa guarigione dell'ustione del Paziente B. Nessuno dei pazienti coinvolti in questo studio ha lamentato dolore o ha presentato segni o sintomi riconducibili all'argiria. Inoltre, non sono state osservate discolorazioni della pelle dovute all'accumulo di Ag nei tessuti, nonostante sia stata dimostrata la presenza di un frammento di Ag metallico nel derma del Paziente D. In 18 casi è stato necessario ricorrere all'autotrapianto di pelle, e questo è stato effettuato 23 ± 9 giorni dopo l'ultima applicazione della medicazione contenente AgNPs. I dati raccolti in questo studio sono coerenti con quanto riportato in letteratura [199, 271, 272]. La sicurezza e l'efficacia delle medicazioni contenenti AgNPs è stata dimostrata anche attraverso il confronto con altri trattamenti comunemente utilizzati presso i centri ustioni. Ad esempio Khundkar e collaboratori [192] hanno dimostrato che i prodotti contenenti AgNPs sono in grado di ridurre il tempo necessario per ottenere una completa riepitelizzazione e la necessità di ricorrere a trapianti di cute, rispetto a quanto si può ottenere con l'utilizzo di argento sulfadiazina o soluzioni antibiotiche contenenti neomicina e polimixina. Altri autori hanno invece dimostrato che l'utilizzo dell'Acticoat™ Flex3 riduce la durata dell'ospedalizzazione rispetto ai giorni necessari utilizzando altri tipi di medicazione da contatto che non contengono Ag. I dati di letteratura, le osservazioni cliniche effettuate presso il Centro Ustioni di Padova e i risultati ottenuti attraverso gli esperimenti sulle colture cellulari e sui pazienti A, B, C e D confermano l'efficacia e la sicurezza dei prodotti contenenti AgNPs.

7.6 LIMITI DEL LAVORO

Uno dei maggiori limiti di questo studio è il numero ridotto di pazienti coinvolti nello studio. In questo progetto, infatti, sono stati arruolati solo 4 pazienti, ed è stato necessario decidere quali campioni destinare alle specifiche analisi a causa delle risorse limitate. In particolare, le analisi TEM sono state condotte solo su due campioni prelevati dallo stesso paziente e dopo una singola applicazione dell'Acticoat™ Flex3. Purtroppo non è stato possibile effettuare le indagini di microscopia elettronica a trasmissione su tutti i campioni prelevati a causa dell'elevato costo delle analisi. Inoltre, gli studi di distribuzione dell'Ag effettuati mediante LA-ICP-MS sono stati condotti solo su campioni prelevati entro due settimane dall'inizio del trattamento. Sarebbe utile prelevare dei campioni a distanza di tempo e dai medesimi pazienti al fine di valutare gli effetti collaterali e il destino della AgNPs che sono state rilasciate nel derma. Sebbene il LA-ICP-MS sia una tecnica molto efficace nel produrre immagini dettagliate della distribuzione degli elementi nei campioni biologici, e recentemente siano stati fatti

notevoli progressi nel migliorare la risoluzione spaziale [240], non è ancora possibile utilizzare questa tecnica per verificare la presenza di AgNPs piuttosto che di Ag⁺ nei campioni oggetto di studio. Al fine di chiarire quali specie di Ag siano presenti nei campioni di pelle prelevati dai pazienti, come la speciazione dell'Ag cambi nel corso del processo di guarigione e lungo il profilo della lesione, ed infine attraverso quali meccanismi l'Ag interagisca con le proteine, sono state condotte analisi di μ XANES presso l'European Synchrotron Radiation Facility di Grenoble. I risultati di questi esperimenti sono ancora in fase di elaborazione e verranno presentati alla comunità scientifica nel più breve tempo possibile.

7.7 CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio indicano la sicurezza dei prodotti per la cura delle ferite contenenti AgNPs. Le analisi condotte sulle biopsie di pelle prelevate da 4 pazienti trattati con Acticoat™ Flex 3 indicano che il trattamento con Ag non ha effetti tossici sui tessuti della cute. Le immagini acquisite al TEM hanno evidenziato l'assenza di necrosi o apoptosi delle cellule dermiche, nonostante la presenza di numerosi aggregati di AgNPs all'interno del citoplasma. La presenza di Ag nel derma, anche a elevate concentrazioni come quelle osservate nel campione prelevato dal paziente D, non interferisce con il processo di guarigione della lesione. Per la prima volta è stato possibile dimostrare la presenza di Ag nelle pareti dei vasi sanguigni, e verificare l'assenza di Ag nel tessuto adiposo. Una volta ottenuta la riepitelizzazione della ferita, l'Ag non è in grado di attraversare la nuova epidermide. Questo dato è stato ottenuto su campioni prelevati da due pazienti diversi, e analizzando i campioni mediante TEM e LA-ICP-MS. E' stato osservato che dopo l'applicazione dell'Acticoat™ Flex 3 per un periodo di tempo anche esteso (17 giorni), è possibile ottenere la guarigione completa della lesione e ripristinare la struttura nativa della pelle. Le AgNPs, quindi, non sembrano agire negativamente sulla proliferazione dei fibroblasti e dei cheratinociti, ma consentono il normale processo di guarigione della ferita e il ripristino della normale struttura della cute.

Capitolo 8

8.1 CONCLUSIONI GENERALI

In questo lavoro di ricerca è utilizzato un approccio multidisciplinare finalizzato alla comprensione dei meccanismi di azione delle medicazioni contenenti argento e in particolare argento nanoparticellare. Il progetto è stato condotto in collaborazione con l'Unità Operativa Complessa di Chirurgia Plastica Clinica e Centro Ustioni dell'Università di Padova. La caratterizzazione chimico fisica delle medicazioni ha permesso di chiarire quale fosse la specie di argento presente e determinarne la concentrazione. I risultati conseguiti hanno confermato i valori di concentrazione dichiarati dai singoli produttori ed è stato, inoltre, possibile verificare come l'argento fosse uniformemente distribuito sull'intera superficie delle medicazioni.

Gli studi condotti per determinare le cinetiche di rilascio dell'Ag da parte delle medicazioni più frequentemente utilizzate presso il Centro Ustioni di Padova hanno evidenziato come questi prodotti rilascino elevate quantità di Ag in tempi molto rapidi. È stato, inoltre, verificato che la presenza di proteine all'interno della soluzione di rilascio favorisce il rilascio di Ag da parte dei prodotti e consente all'Ag di restare solubile nonostante l'elevata concentrazione di Cl⁻. I risultati ottenuti in questa parte del lavoro hanno contribuito a migliorare l'approccio clinico nell'applicazione dei bendaggi. È stato, infatti, possibile portare delle evidenze sperimentali a sostegno del consiglio di non utilizzare la soluzione fisiologica per inumidire le medicazioni contenenti Ag prima di applicarle sulle ustioni. La pratica di inumidire le medicazioni per ridurre la probabilità che queste aderiscano al letto della ferita è piuttosto diffusa tra gli operatori sanitari: l'utilizzo della soluzione salina è però da scoraggiare in quanto provoca l'inattivazione della medicazione e impedisce il rilascio del principio attivo. Attraverso questa serie di esperimenti è stato possibile anche indicare quali prodotti sono caratterizzati da rilasci estremamente veloci e quali prodotti, essendo caratterizzati da un rilascio più lento e più controllato, restano attivi più a lungo e quindi potrebbero essere lasciati sul paziente per un tempo maggiore rispetto a quello indicato dal produttore, se le condizioni locali lo consentono.

Il ruolo fondamentale che rivestono le proteine e gli essudati nel trasporto dell'Ag all'interno dei tessuti lesionati è stato confermato anche attraverso la stima del rilascio *in vivo* condotto per via indiretta. In questa parte del lavoro è stato valutato il rilascio di Ag nei pazienti attraverso la determinazione della concentrazione di Ag ancora presente nelle medicazioni dopo il loro utilizzo su ustioni profonde. Dal confronto dei risultati ottenuti in soluzione e

dall'analisi delle medicazioni usate, è emerso che i valori trovati *in vivo* sono molto maggiori rispetto a quelli ottenuti in soluzione. I rilasci stimati indirettamente *in vivo* risultano però maggiori anche di quelli ipotizzati attraverso la determinazione della concentrazione di Ag nelle biopsie cutanee prelevate dai pazienti trattati, indicando così che solo una minima parte dell'Ag rilasciato si accumula *in situ*. Una correlazione positiva è stata, inoltre, riscontrata tra la quantità di Ag rilasciata e la gravità della ferita, confermando, quindi, nuovamente il ruolo fondamentale rivestito dai fluidi e dagli essudati nel favorire il rilascio di Ag da parte delle medicazioni.

La dimostrazione che le medicazioni rilasciano in tempi rapidi molto elevate quantità di Ag ha deviato la ricerca verso uno studio pilota finalizzato a valutare la possibile citotossicità indotta dalla medicazione più utilizzata presso il Centro Ustioni di Padova nei confronti delle cellule che costituiscono il derma. Questa medicazione, l'Acticoat™ Flex3, è l'unico prodotto contenente AgNPs. Considerato che le AgNPs attraggono un grande interesse sia scientifico sia commerciale poichè sono presenti all'interno di molti prodotti di uso comune, e alla luce del fatto che non è ancora stato chiarito come le AgNPs interagiscano con la cute umana, nonostante l'utilizzo massivo che viene fatto di questi materiali nanostrutturati, l'Acticoat™ Flex3 si presentava come un buon prodotto modello per la valutazione del comportamento chimico, della sicurezza e biocompatibilità delle AgNPs.

I risultati di questo studio preliminare condotto sulle colture cellulari tridimensionali di fibroblasti umani, sebbene molto limitato per numero di campioni e con validità locale, sembrano indicare la sicurezza e biocompatibilità della medicazione Acticoat™ Flex3. I risultati delle indagini morfologiche condotte sui campioni hanno evidenziato, infatti, che nonostante la ridotta attività mitocondriale, i fibroblasti sono vivi e non presentano segni di apoptosi. Sebbene sia stato dimostrato che le AgNPs sono in grado di ridurre la funzionalità mitocondriale, questo fenomeno sembra essere provvisorio e limitato nel tempo come suggerito dalle osservazioni effettuate durante le analisi TEM condotte su alcune biopsie cutanee prelevate durante il trattamento con Acticoat™ Flex3.

Nell'ultima parte del progetto di ricerca è stato possibile studiare la chimica delle AgNPs, la loro distribuzione nella pelle dei pazienti ustionati e come questa si modifichi durante il processo di guarigione delle ferite. Lo studio è stato condotto su biopsie cutanee prelevate da 4 pazienti trattati con Acticoat™ Flex3, a intervalli regolari di tempo, durante il processo di guarigione della lesione. Sono state svolte analisi TEM finalizzate a valutare la localizzazione subcellulare delle AgNPs, mentre le analisi di LA-ICP-MS sono state svolte per ottenere mappe

di distribuzione dell'Ag ad elevata risoluzione e valutare i cambiamenti nella distribuzione di questo elemento nel tempo. Le analisi istologiche condotte sulle biopsie di pelle indicano che il trattamento con Ag non ha effetti tossici sui tessuti della cute, rafforzando i risultati ottenuti *in vitro*. Le immagini acquisite al TEM hanno evidenziato, infatti, l'assenza di necrosi o apoptosi delle cellule dermiche, nonostante la presenza di numerosi aggregati di AgNPs all'interno del citoplasma. La presenza di Ag nel derma, anche a elevate concentrazioni, non interferisce con il processo di guarigione della lesione. Le analisi di LA-ICP-MS hanno permesso di dimostrare per la prima volta la presenza di Ag nelle pareti dei vasi sanguigni, e verificare l'assenza di Ag nel tessuto adiposo. E' stato dimostrato che una volta ottenuta la riepitelizzazione della ferita, l'Ag non è in grado di attraversare la nuova epidermide. Questo dato è stato ottenuto su campioni prelevati da due pazienti diversi, e analizzando i campioni mediante TEM e LA-ICP-MS. E' stato osservato che dopo l'applicazione dell'Acticoat™ Flex 3 per un periodo di tempo anche esteso (17 giorni), è possibile ottenere la guarigione completa della lesione e ripristinare la struttura nativa della pelle. Le AgNPs, quindi, non sembrano agire negativamente sulla proliferazione dei fibroblasti e dei cheratinociti, ma consentono il normale processo di guarigione della ferita e il ripristino della normale struttura della cute.

Nel corso di questo lavoro di ricerca è stato, inoltre, osservato come la distribuzione dello zinco cambi durante il trattamento con le medicazioni contenenti AgNPs. Lo zinco è ritenuto un marcatore del processo infiammatorio in quanto la concentrazione tissutale di zinco e la sua distribuzione giocano un ruolo fondamentale e variano con il progredire del processo di riparazione delle lesioni. Le analisi condotte sulle biopsie cutanee suggeriscono che il trattamento con AgNPs alteri la distribuzione dello zinco, ne riduca la quantità nel tessuto infiammato e promuova la guarigione della lesione. I risultati riportati in questo lavoro di ricerca indicano che l'Ag non solo non altera il normale processo di guarigione della ferita ma sembra possedere proprietà antinfiammatorie, in aggiunta alle ben note caratteristiche antibatteriche.

Questo lavoro ha visto l'impiego di metodiche proprie della chimica analitica e della ricerca biomedica al fine di condurre uno studio multidisciplinare volto alla caratterizzazione chimico fisica e alla comprensione dei meccanismi di azione di alcune medicazioni contenenti Ag, ampiamente utilizzate presso i centri ustione di tutto il mondo. Per la prima volta è stato possibile utilizzare un approccio olistico interdisciplinare per studiare il comportamento, la speciazione e la distribuzione delle AgNPs nella cute dei pazienti ustionati ed avere alcune informazioni preliminari sulla sicurezza dei materiali nanostrutturati.

Bibliografia

- [1] C.R. Hammond, in: D. Lide (Ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, internet version 2005, CRC Press, Boca Raton, 2005, p. 1.
- [2] S. Riedel, M. Kaupp, *Coordination Chemistry Reviews*, 253 (2009) 606.
- [3] P. Craddock, *Isij International*, 54 (2014) 1085.
- [4] H. Lin, G.S. Frankel, *Corrosion*, 69 (2013) 1060.
- [5] T. Lanzano, M. Bertram, M. De Palo, C. Wagner, K. Zyla, T.E. Graedel, *Resources, Conservation and Recycling*, 46 (2006) 27.
- [6] J. Johnson, J. Jirikowic, M. Bertram, D. van Beers, R.B. Gordon, K. Henderson, R.J. Klee, T. Lanzano, R. Lifset, L. Oetjen, T.E. Graedel, *Environmental Science & Technology*, 39 (2005) 4655.
- [7] T.W. Purcell, J.J. Peters, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 (1998) 539.
- [8] M. Curic, D. Janc, *Theoretical and Applied Climatology*, 115 (2014) 609.
- [9] H.J. Klasen, *Burns*, 26 (2000) 117.
- [10] P. Maurye, A. Basu, A. Gupta, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117 (2014) 769.
- [11] J.M. Lopez-Cepero, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52 (2004) 211.
- [12] M.D. McGavin, *Veterinary Pathology*, 51 (2014) 9.
- [13] G.D. Divincenzo, C.J. Giordano, L.S. Schriever, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 56 (1985) 207.
- [14] E. Vlachou, E. Chipp, E. Shale, Y.T. Wilson, R. Papini, N.S. Moiemmen, *Burns*, 33 (2007) 979.
- [15] L.P. Bowden, M.C. Royer, J.R. Hallman, M. Lewin-Smith, G.P. Lupton, *Journal of Cutaneous Pathology*, 38 (2011) 832.
- [16] Y. Kim, H.S. Suh, H.J. Cha, S.H. Kim, K.S. Jeong, D.H. Kim, *American Journal of Industrial Medicine*, 52 (2009) 246.
- [17] H.B. Kwon, J.H. Lee, S.H. Lee, A.Y. Lee, J.S. Choi, Y.S. Ahn, *Annals of Dermatology*, 21 (2009) 308.
- [18] A. Gopal, J. Coventry, J. Wan, H. Roginski, S. Ajlouni, *Food Microbiology*, 27 (2010) 210.
- [19] C. Chaidez, M. Soto, C. Martinez, C. Viera, J. Leon, *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology*, 109 (2009).
- [20] A. Downham, P. Collins, *International Journal of Food Science and Technology*, 35 (2000) 5.
- [21] M.J.A. Schroder, *Food Quality and Consumer Value*, Ed Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 2003 p. 167.
- [22] Y.S. Kim, J.S. Kim, H.S. Cho, D.S. Rha, J.M. Kim, J.D. Park, B.S. Choi, R. Lim, H.K. Chang, Y.H. Chung, I.H. Kwon, J. Jeong, B.S. Han, I.J. Yu, *Inhalation Toxicology*, 20 (2008) 575.
- [23] K.F. Bader, *Plastic and reconstructive surgery*, 37 (1966) 550.
- [24] P.L. Drake, K.J. Hazelwood, *Annals of Occupational Hygiene*, 49 (2005) 575.
- [25] J.L. Tang, L. Xiong, S. Wang, J.Y. Wang, L. Liu, J.G. Li, F.Q. Yuan, T.F. Xi, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9 (2009) 4924.
- [26] L. Chhabra, P. Sareen, N. Trivedi, *BMJ case reports* 2013, (2013) doi:10.1136/bcr-2013-009728.
- [27] K. Stafeeva, M. Erlanger, R. Velez-Montoya, J.L. Olson, *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 6 (2012) 2033.
- [28] C.G. Teran, S. Sura, P. Cabandugama, C. Berson, *Clinics and practice*, 1 (2011) e43.
- [29] J. Liu, Z. Wang, F.D. Liu, A.B. Kane, R.H. Hurt, *Acs Nano*, 6 (2012) 9887.

- [30] S.A. Armitage, M.A. White, H.K. Wilson, *Annals of Occupational Hygiene*, 40 (1996) 331.
- [31] H.J. Klasen, *Burns*, 26 (2000) 131.
- [32] C.A. Moyer, *Journal of the National Medical Association*, 57 (1965) 95.
- [33] R. White, R. Cooper, *Wounds UK*, 1 (2005) 51.
- [34] Z.M. Rashaan, P. Krijnen, R.R.M. Klamer, I.B. Schipper, O.M. Dekkers, R.S. Breederveld, *Wound Repair and Regeneration*, 22 (2014) 473.
- [35] J.J. Castellano, S.M. Shafii, F. Ko, G. Donate, T.E. Wright, R.J. Mannari, W.G. Payne, D.J. Smith, M.C. Robson, *International Wound Journal*, 4 (2007) 114.
- [36] M. Ip, S.L. Lui, V.K.M. Poon, I. Lung, A. Burd, *Journal of Medical Microbiology*, 55 (2006) 59.
- [37] P. Aramwit, P. Muangman, N. Namviriyachote, T. Srichana, *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (2010) 2864.
- [38] K. Dunn, V. Edwards-Jones, *Burns*, 30, Supplement 1 (2004) S1.
- [39] S.S. Thomas, J.C. Lawrence, A. Thomas, *Journal of wound care*, 4 (1995) 218.
- [40] D. Okan, K. Woo, R.G. Sibbald, *Advances in Skin Wound Care*, 20 (2007) 326.
- [41] A. Burd, C.H. Kwok, S.C. Hung, H.S. Chan, H. Gu, W.K. Lam, L. Huang, *Wound Repair Regeneration*, 15 (2007) 94.
- [42] M. Kempf, R.M. Kimble, L. Cuttle, *Burns*, 37 (2011) 994.
- [43] M. Trop, M. Novak, S. Rodl, B. Hellbom, W. Kroell, W. Goessler, *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, 60 (2006) 648.
- [44] M. Rai, K. Kon, A. Ingle, N. Duran, S. Galdiero, M. Galdiero, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (2014) 1951.
- [45] S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller, M. Epple, *Chemistry of Materials*, 22 (2010) 4548.
- [46] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, *Biotechnology Advances*, 27 (2009) 76.
- [47] R. Foldbjerg, P. Olesen, M. Hougaard, D.A. Dang, H.J. Hoffmann, H. Autrup, *Toxicology Letters*, 190 (2009) 156.
- [48] Y.H. Hsin, C.F. Chena, S. Huang, T.S. Shih, P.S. Lai, P.J. Chueh, *Toxicology Letters*, 179 (2008) 130.
- [49] C. Carlson, S.M. Hussain, A.M. Schrand, L.K. Braydich-Stolle, K.L. Hess, R.L. Jones, J.J. Schlager, *Journal of Physical Chemistry B*, 112 (2008) 13608.
- [50] C.N. Lok, C.M. Ho, R. Chen, P.K.H. Tam, J.F. Chiu, C.M. Che, *Journal of Proteome Research*, 7 (2008) 2351.
- [51] N. Khandelwal, G. Kaur, N. Kumar, A. Tiwari, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9 (2014) 175.
- [52] S. Galdiero, A. Falanga, M. Vitiello, M. Cantisani, V. Marra, M. Galdiero, *Molecules*, 16 (2011) 8894.
- [53] H.H. Lara, N.V. Ayala-Nunez, L. Ixtepan-Turrent, C. Rodriguez-Padilla, *Journal of Nanobiotechnology*, 8 (2010) 1.
- [54] S. Silver, *Fems Microbiology Reviews*, 27 (2003) 341.
- [55] E.J. Woods, C.A. Cochrane, S.L. Percival, *Veterinary Microbiology*, 138 (2009) 325.
- [56] M. Muller, N.D. Merrett, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58 (2014) 5492.
- [57] M. Singh, S. Singh, S. Prasad, I.S. Gambhir, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3 (2008) 115.
- [58] S.P. Zhong, Y.Z. Zhang, C.T. Lim, *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2 (2010) 510.
- [59] B. Pomahac, T. Svensjo, F. Yao, H. Brown, E. Eriksson, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 9 (1998) 333.
- [60] A.J. Singer, R.A. Clark, *The New England Journal of Medicine*, 341 (1999) 738.
- [61] R.K. Assoian, M.B. Sporn, *Journal of Cell Biology*, 102 (1986) 1217.

- [62] S.E. Lynch, R.B. Colvin, H.N. Antoniades, *The Journal of Clinical Investigation*, 84 (1989) 640.
- [63] G.F. Pierce, T.A. Mustoe, B.W. Altmann, T.F. Deuel, A. Thomason, *Journal of Cellular Biochemistry*, 45 (1991) 319.
- [64] G. Schultz, D.S. Rotatori, W. Clark, *Journal of Cellular Biochemistry*, 45 (1991) 346.
- [65] M.H. Gartner, J.D. Benson, M.D. Caldwell, *Journal of Surgical Research*, 52 (1992) 389.
- [66] H. Nagase, J.F. Woessner, *Journal of Biological Chemistry*, 274 (1999) 21491.
- [67] J.F. Woessner, *The FASEB Journal*, 5 (1991) 2145.
- [68] R.S. Kirsner, H. Orsted, J.B. Wright, *Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice*, 13 (2001) 4.
- [69] A.D. Widgerow, *Burns*, 36 (2010) 965.
- [70] N.J. Trengove, M.C. Stacey, S. MacAuley, N. Bennett, J. Gibson, F. Burslem, G. Murphy, G. Schultz, *Wound Repair Regeneration*, 7 (1999) 442.
- [71] B. Barrick, E.J. Campbell, C.A. Owen, *Wound Repair Regeneration*, 6 (1999) 410.
- [72] C. Gradin, L. Ferroni, L. Lancerotto, V. Vindigni, C. Rigo, M. Roman, W. Cairns, B. Zavan, in: A. Kumar, H. Mansour, A. Friedman, E. Blough (Eds.), *Nanomedicine in Drug Delivery*, CRC Press, Boca Raton, 2013, p. 143.
- [73] U.K. Saarialhokere, A.P. Pentland, H. Birkedal-hansen, W.C. Parks, H.G. Welgus, *Journal of Clinical Investigation*, 94 (1994) 79.
- [74] P.J. Jensen, R.M. Lavker, *Cell Growth & Differentiation*, 7 (1996) 1793.
- [75] N.N. Nissen, P.J. Polverini, A.E. Koch, M.V. Volin, R.L. Gamelli, L.A. DiPietro, *American Journal of Pathology*, 152 (1998) 1445.
- [76] G. Gabbiani, *Journal of Pathology*, 200 (2003) 500.
- [77] T. Kondo, Y. Ishida, *Forensic Science International*, 203 (2010) 93.
- [78] K.J. Cross, T.A. Mustoe, *Surgical Clinics of North America*, 83 (2003) 531.
- [79] C.L. Baum, C.J. Arpey, *Dermatologic Surgery*, 31 (2005) 674.
- [80] M.P. Rodero, K. Khosrotehrani, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3 (2010) 643.
- [81] S. Werner, R. Grose, *Physiological Reviews*, 83 (2003) 835.
- [82] L. William J, *Principles of Regenerative Medicine*, Academic Press, San Diego, 2008, p. 724.
- [83] R. Thomas, in: C. Press (Ed.), *Practical guide to icp-ms. A tutorial for beginners*. Second edition, Taylor & Francis group, Boca Raton, FL 33487-2742, 2007, p. 137.
- [84] K. Boutakhrif, F. Bolle, J.M. Degroodt, L. Goeyens, in: S. Cairoli (Ed.), *The determination of chemical elements in food: applications for atomic and mass spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2007, p. 3.
- [85] I. De Schrijver, M. Aramendia, L. Vincze, M. Resano, A. Dumoulin, F. Vanhaecke, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 62 (2007) 1185.
- [86] M. Roman, C. Rigo, I. Munivrana, V. Vindigni, B. Azzena, C. Barbante, F. Fenzi, P. Guerriero, W.R.L. Cairns, *Talanta*, 115 (2013) 94.
- [87] J.S.F. Pereira, C.L. Knorr, L.S.F. Pereira, D.P. Moraes, J.N.G. Paniz, E.M.M. Flores, G. Knapp, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26 (2011) 1849.
- [88] H. Sakurai, J. Noro, A. Kawase, M. Fujinami, K. Oguma, *Analytical Sciences*, 22 (2006) 225.
- [89] Y. Malaxechevarria, E. Millan, *Spectroscopy Letters*, 42 (2009) 12.
- [90] N. Longas, R. Garcia Arrona, M. Ostra, E. Millan, *Atomic Spectroscopy*, 30 (2009) 47.
- [91] K.S. Subramanian, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 51 (1996) 291.
- [92] R. Thomas, in: C. Press (Ed.), *Practical guide to icp-ms. A tutorial for beginners*, Taylor & Francis group, Boca Raton, FL 33487-2742, 2007, p. 137.
- [93] P.C. Kruger, L.M. Schell, A.D. Stark, P.J. Parsons, *Metallomics*, 2 (2010) 621.

- [94] Z. Arslan, M. Ates, W. McDuffy, M.S. Agachan, I.O. Farah, W.W. Yu, A.J. Bednar, *Journal of Hazardous Materials*, 192 (2011) 192.
- [95] B.L. Batista, D. Grotto, J.L. Rodrigues, V.C.D. Souza, F. Barbosa, *Analytica Chimica Acta*, 646 (2009) 23.
- [96] P. Heitland, H.D. Koester, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20 (2006) 253.
- [97] B.A. Yankner, T. Lu, *Journal of Biological Chemistry*, 284 (2009) 4754.
- [98] D. Devos, C. Moreau, J.C. Devedjian, J. Kluza, M. Petrault, C. Laloux, A. Jonneaux, G. Rycckewaert, G. Garcon, N. Rouaix, A. Duhamel, P. Jissendi, K. Dujardin, F. Auger, L. Ravasi, L. Hopes, G. Grolez, W. Firdaus, B. Sablonniere, I. Strubi-Vuillaume, N. Zahr, A. Destee, J.C. Corvol, D. Poltl, M. Leist, C. Rose, L. Defebvre, P. Marchetti, Z.I. Cabantchik, R. Bordet, *Antioxidants & Redox Signaling*, 21 (2014) 195.
- [99] Y. Chtourou, H. Fetoui, R. Gdoura, *Biological Trace Element Research*, 158 (2014) 376.
- [100] J. Moreda-Pineiro, A. Moreda-Pineiro, V. Romaris-Hortas, C. Moscoso-Perez, P. Lopez-Mahia, S. Muniategui-Lorenzo, P. Bermejo-Barrera, D. Prada-Rodriguez, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 30 (2011) 324.
- [101] M.I. Castro-Gonzalez, M. Mendez-Armenta, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26 (2008) 263.
- [102] M. Korbas, T.C. MacDonald, I.J. Pickering, G.N. George, P.H. Krone, *Acs Chemical Biology*, 7 (2012) 410.
- [103] D. Hare, S. Tolmachev, A. James, D. Bishop, C. Austin, F. Fryer, P. Doble, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 3176.
- [104] R. McRae, P. Bagchi, S. Sumalekshmy, C.J. Fahrni, *Chemical Reviews*, 109 (2009) 4780.
- [105] A. Kindness, C.N. Sekaran, J. Feldmann, *Clinical Chemistry*, 49 (2003) 1916.
- [106] F. Watt, *Cellular and Molecular Biology*, 42 (1996) 17.
- [107] E.L. Que, D.W. Domaille, C.J. Chang, *Chemical Reviews*, 108 (2008) 1517.
- [108] P.A. Franklin, R.G.L. Pullen, G.H. Hall, *Neurochemical Research*, 17 (1992) 767.
- [109] A. Takeda, T. Akiyama, J. Sawashita, S. Okada, *Brain Research*, 640 (1994) 341.
- [110] A. Takeda, K. Takatsuka, N. Sotogaku, N. Oku, *Neurochemistry International*, 41 (2002) 223.
- [111] A. Takeda, S. Ishiwatari, S. Okada, *Journal of Neuroscience Research*, 59 (2000) 542.
- [112] A. Takeda, H. Tamano, S. Enomoto, N. Oku, *Cancer Research*, 61 (2001) 5065.
- [113] R. Pamphlett, G. Danscher, J. Rungby, M. Stoltenberg, *Environmental Research*, 82 (2000) 258.
- [114] G. Danscher, M. Stoltenberg, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53 (2005) 141.
- [115] B. Szewczyk, M. Sowa, A. Czupryn, J.M. Wieronska, P. Branski, K. Sadlik, W. Opoka, W. Piekoszewski, M. Smialowska, J. Skangiel-Kramska, A. Pilc, G. Nowak, *Brain Research*, 1090 (2006) 69.
- [116] G. Danscher, A. Larsen, *Histochemistry and Cell Biology*, 133 (2010) 367.
- [117] L.J. Locht, K. Smidt, J. Rungby, M. Stoltenberg, A. Larsen, *Histology and Histopathology*, 26 (2011) 689.
- [118] N.S. Loumbourdis, G. Danscher, *Biometals*, 21 (2008) 311.
- [119] S.G. Boxer, M.L. Kraft, P.K. Weber, *Annual Review of Biophysics*, 38 (2009) 53.
- [120] Z. Qin, J.A. Caruso, B. Lai, A. Matusch, J.S. Becker, *Metallomics*, 3 (2011) 28.
- [121] M. Gajda, K. Banas, A. Banas, J. Jawien, L. Mateuszuk, S. Chlopicki, W.M. Kwiatek, T. Cichockil, G. Falkenberg, *X-Ray Spectrometry*, 37 (2008) 495.
- [122] J. Anne, N.P. Edwards, R.A. Wogelius, A.R. Tumarkin-Deratzian, W.I. Sellers, A. van Veelen, U. Bergmann, D. Sokaras, R. Alonso-Mori, K. Ignatyev, V.M. Egerton, P.L. Manning, *Journal of the Royal Society Interface*, 11 (2014) 40277.

- [123] A.L.M. Silva, R. Figueroa, A. Jaramillo, M.L. Carvalho, J.F.C.A. Veloso, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 86 (2013) 115.
- [124] I. Konz, B. Fernandez, M. Luisa Fernandez, R. Pereiro, H. Gonzalez, L. Alvarez, M. Coca-Prados, A. Sanz-Medel, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (2013) 3091.
- [125] I. Konz, B. Fernandez, M. Luisa Fernandez, R. Pereiro, H. Gonzalez-Iglesias, M. Coca-Prados, A. Sanz-Medel, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 2343.
- [126] D. Guimaraes, M.L. Carvalho, V. Geraldos, I. Rocha, L.C. Alves, J.P. Santos, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26 (2012) 285.
- [127] D.S. Urgast, O. Ou, M.-J. Gordon, A. Raab, G.F. Nixon, I.-S. Kwun, J.H. Beattie, J. Feldmann, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (2012) 287.
- [128] J.S. Becker, U. Breuer, H.-F. Hsieh, T. Osterholt, U. Kumtabtim, B. Wu, A. Matusch, J.A. Caruso, Z. Qin, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 9528.
- [129] O. Reifschneider, C.A. Wehe, K. Diebold, C. Becker, M. Sperling, U. Karst, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28 (2013) 989.
- [130] T. Swanston, T. Varney, I. Coulthard, R.F. Feng, B. Bewer, R. Murphy, C. Hennig, D. Cooper, *Journal of Archaeological Science*, 39 (2012) 2409.
- [131] R. McRae, B. Lai, S. Vogt, C.J. Fahrni, *Journal of Structural Biology*, 155 (2006) 22.
- [132] R. Thomas, *Practical Guide To ICP-MS - A Tutorial for Beginners*, CRC Press, Boca Raton, 2007.
- [133] S. Nelms, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, CRC Press, Boca Raton, 2005.
- [134] D. Günther, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 372 (2002) 31.
- [135] N.I. Ward, S.F. Durrant, A.L. Gray, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 7 (1992) 1139.
- [136] P.M. Outridge, R.D. Evans, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 10 (1995) 595.
- [137] A.M. Ghazi, J.C. Wataha, N.L. O'Dell, B.B. Singh, R. Simmons, S. Shuttleworth, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (2002) 1295.
- [138] J. Feldmann, A. Kindness, P. Ek, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (2002) 813.
- [139] J. Sabine Becker, *Journal of Mass Spectrometry*, 48 (2013) 255.
- [140] J.S. Becker, *International Journal of Mass Spectrometry*, 289 (2010) 65.
- [141] M.M. Pornwilard, R. Weiskirchen, N. Gassler, A.K. Bosserhoff, J.S. Becker, *Plos One*, 8 (2013) 12.
- [142] D.S. Urgast, D.G. Ellingsen, B. Berlinger, E. Eilertsen, G. Friisk, V. Skaug, Y. Thomassen, J.H. Beattie, I.-S. Kwun, J. Feldmann, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404 (2012) 89.
- [143] S. Mercan, N. Bolukbasi, M.K. Bolukbasi, M. Yayla, S. Cengiz, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27 (2013) 4002.
- [144] J. Seuma, J. Bunch, A. Cox, C. McLeod, J. Bell, C. Murray, *Proteomics*, 8 (2008) 3775.
- [145] C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, N. Jakubowski, U. Panne, *Analytical Chemistry*, 83 (2011) 8177.
- [146] H.A.O. Wang, D. Grolimund, C. Giesen, C.N. Borca, J.R.H. Shaw-Stewart, B. Bodenmiller, D. Gunther, *Analytical Chemistry*, 85 (2013) 10107.
- [147] M. Xu, S. Frelon, O. Simon, R. Lobinski, S. Mounicou, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 1063.
- [148] E. Moreno-Gordaliza, D. Esteban-Fernandez, C. Giesen, K. Lehmann, A. Lazaro, A. Tejedor, C. Scheler, B. Canas, N. Jakubowski, M.W. Linscheid, M. Milagros Gomez-Gomez, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27 (2012) 1474.
- [149] M.S. Jimenez, L. Rodriguez, J.R. Bertolin, M.T. Gomez, J.R. Castillo, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (2013) 359.
- [150] A.B. Nowakowski, W.J. Wobig, D.H. Petering, *Metallomics*, 6 (2014) 1068.
- [151] D.S. Urgast, J. Feldmann, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28 (2013) 1367.

- [152] D.S. Urgast, S. Hill, I.-S. Kwun, J.H. Beattie, H. Goenaga-Infante, J. Feldmann, *Metallomics*, 4 (2012) 1057.
- [153] D. Bleiner, D. Gunther, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16 (2001) 449.
- [154] E.L. Gurevich, R. Hergenroeder, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22 (2007) 1043.
- [155] D. Asogan, B.L. Sharp, C.J.P. O'Connor, D.A. Green, R.W. Hutchinson, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24 (2009) 917.
- [156] J.A.T. Pugh, A.G. Cox, C.W. McLeod, J. Bunch, B. Whitby, B. Gordon, T. Kalber, E. White, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26 (2011) 1667.
- [157] T. Osterholt, D. Salber, A. Matusch, J.S. Becker, C. Palm, *International Journal of Mass Spectrometry*, 307 (2011) 232.
- [158] I. Konz, B. Fernandez, M. Luisa Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403 (2012) 2113.
- [159] J. Lear, D. Hare, P. Adlard, D. Finkelstein, P. Doble, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27 (2012) 159.
- [160] D. Gunther, C. A. Heinrich, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14 (1999) 1369.
- [161] E. Hoffmann, H. Stephanowitz, E. Ullrich, J. Skole, C. Ludke, B. Hoffmann, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15 (2000) 663.
- [162] C. Austin, F. Fryer, J. Lear, D. Bishop, D. Hare, T. Rawling, L. Kirkup, A. McDonagh, P. Doble, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26 (2011) 1494.
- [163] D.A. Frick, D. Guenther, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27 (2012) 1294.
- [164] J. O'Reilly, D. Douglas, J. Braybrook, P.W. So, E. Vergucht, J. Garrevoet, B. Vekemans, L. Vincze, H. Goenaga-Infante, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29 (2014) 1378.
- [165] C. Austin, D. Hare, T. Rawling, A.M. McDonagh, P. Doble, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25 (2010) 722.
- [166] D. Hare, C. Austin, P. Doble, *Analyst*, 137 (2012) 1527.
- [167] D.J. Hare, J.L. George, L. Bray, I. Volitakis, A. Vais, T.M. Ryan, R.A. Cherny, A.I. Bush, C.L. Masters, P.A. Adlard, P.A. Doble, D.I. Finkelstein, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29 (2014) 565.
- [168] FDA U.S. Food and Drugs Administration, *Devices approvals and Clearances (Vol. KO22483)*, Food and Drug Administration, Silver Spring, 2003, p. 1.
- [169] FDA U.S. Food and Drugs Administration, *Devices approvals and Clearances (Vol. K080383)*, Food and Drug Administration, Silver Spring, 2008, p. 1.
- [170] P.G. Bowler, S.A. Jones, M. Walker, D. Parsons, *Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 25 (2004) 192.
- [171] S. Areskoug, U. Johannison, M. Prydz, (Vol. 12/529,430), *Molnlicke Health Care, Goteborg (SE)*, 2010, p. 1.
- [172] FDA U.S. Food and Drugs Administration, *Devices approvals and Clearances (Vol. K061554)*, Food and Drug Administration, Silver Spring, 2007, p. 1.
- [173] P. Davies, M. Rippon, *Mepilex Ag: a monograph*, 2nd ed., Holsworthy: Medical Communications, 2011, p. 1
- [174] K. Chiba, I. Inamoto, M. Saeki, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 7 (1992) 115.
- [175] C.J. Park, S.R. Park, S.R. Yang, M.S. Han, K.W. Lee, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 7 (1992) 641.
- [176] M. Resano, P. Marzo, J. Perez-Arantegui, M. Aramendia, C. Cloquet, F. Vanhaecke, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (2008) 1182.
- [177] F. Vanhaecke, G. de Wannemacker, L. Moens, R. Dams, C. Latkoczy, T. Prohaska, G. Stingeder, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13 (1998) 567.
- [178] K.J.R. Rosman, P.D.P. Taylor, *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 27 (1998) 1275.
- [179] J.G. Alonso, *Analytica Chimica Acta*, 312 (1995) 57.

- [180] W. Chen, P. Wee, I.D. Brindle, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15 (2000) 409.
- [181] J.H. Sluyters, M.D. Wijnen, H.J. van den Hul, *Electrochimica Acta*, 5 (1961) 72.
- [182] D. Parsons, P.G. Bowler, V. Myles, S. Jones, *Wounds*, 17 (2005) 222.
- [183] M.H. Cavanagh, R.E. Burrell, P.L. Nadworny, *International Wound Journal*, 7 (2010) 394.
- [184] J.B. Wright, D.L. Hansen, R.E. Burrell, *Wounds*, 10 (1998) 179.
- [185] R. Babu, J.Y. Zhang, E.J. Beckman, M. Virji, W.A. Pasculle, A. Wells, *Biomaterials*, 27 (2006) 4304.
- [186] V. Kostenko, J. Lyczak, K. Turner, R.J. Martinuzzi, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (2010) 5120.
- [187] P. Bowler, D. Parsons, M. Walker, Antimicrobial, silvercontaining wound dressing for continuous release. Squibb Bristol Myers Co., New York (US), applicant. PCT/GB2003/002780. European Patent EP1825841 A1; 2002
- [188] S. P, *The Lancet*, 322 (1983) 532.
- [189] J.K. Lim, L. Saliba, M.J. Smith, P. Curtin, J. McTavish, C. Raine, *British Journal of Plastic Surgery*, 53 (2000) 42.
- [190] J.M. Schierholz, Z. Wachol-Drewek, L.J. Lucas, G. Pulverer, *Zentralblatt Fur Bakteriologie-International Journal of Medical Microbiology Virology Parasitology and Infectious Diseases*, 287 (1998) 411.
- [191] R. Chen, P. Choudhary, R.N. Schurr, P. Bhattacharya, J.M. Brown, P.C. Ke, *Applied Physics Letters*, 100 (2012) 4.
- [192] R. Khundkar, C. Malic, T. Burge, *Burns*, 36 (2010) 751.
- [193] M. Gago, F. Garcia, V. Gaztelu, J. Verdu, P. Lopez, A. Nolasco, *Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice*, 20 (2008) 273.
- [194] J. Fong, F. Wood, *International Journal of Nanomedicine*, 1 (2006) 441.
- [195] L.C. Gruen, *Biochimica et biophysica acta*, 386 (1975) 270.
- [196] H.B. Li, K.W.M. Siu, R. Guevremont, J.C.Y. LeBlanc, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 8 (1997) 781.
- [197] M.L.W. Knetsch, L.H. Koole, *Polymers*, 3 (2011) 340.
- [198] X. Li, J.J. Lenhart, H.W. Walker, *Langmuir*, 26 (2010) 16690.
- [199] L. Cuttle, S. Naidu, J. Mill, W. Hoskins, K. Das, R.M. Kimble, *Burns*, 33 (2007) 701.
- [200] J. Asz, D. Asz, R. Moushey, J. Seigel, S.B. Mallory, R.P. Foglia, *Journal of Pediatric Surgery*, 41 (2006) e9.
- [201] M. Walker, C.A. Cochrane, P.G. Bowler, D. Parsons, P. Bradshaw, *Ostomy Wound Management*, 52 (2006) 42.
- [202] E.W. Rice, D.B. Lukasiewicz, *Clinical Chemistry*, 3 (1957) 160.
- [203] J.C. Kerihuel, *Journal of wound care*, 19 (2010) 208.
- [204] M.J. Waring, D. Parsons, *Biomaterials*, 22 (2001) 903.
- [205] S. Blome-Eberwein, R.M. Johnson, S.F. Miller, D.M. Caruso, M.H. Jordan, S. Milner, E.E. Tredget, K.M. Sittig, L. Smith, *Burns*, 36 (2010) 665.
- [206] S.J. Chong, S. Ahmed, J.M. Tay, C. Song, T.T. Tan, *Burns*, 37 (2011) 1349.
- [207] E. Rezaei, H. Safari, M. Naderinasab, H. Aliakbarian, *Burns*, 37 (2011) 805.
- [208] L. Kvitek, A. Panacek, J. Soukupova, M. Kolar, R. Vecerova, R. Pucek, M. Holecova, R. Zboril, *Journal of Physical Chemistry C*, 112 (2008) 5825.
- [209] S. Pal, E.J. Yoon, S.H. Park, E.C. Choi, J.M. Song, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65 (2010) 2134.
- [210] A. Holmes, A. Vinayak, C. Benton, A. Esbenshade, C. Heinselman, D. Frankland, S. Kulkarni, A. Kurtanich, J. Caguiat, *Current Microbiology*, 59 (2009) 526.
- [211] B. Schäfer, J. Tentschert, A. Luch, *Environmental Science & Technology*, 45 (2011) 7589.

- [212] N. Duran, P.D. Marcato, R. De Conti, O.L. Alves, F.T.M. Costa, M. Brocchi, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21 (2010) 949.
- [213] N.S. Moiemmen, E. Shale, K.J. Drysdale, G. Smith, Y.T. Wilson, R. Papini, *Burns*, 37 (2011) 27.
- [214] L.S. Nair, C.T. Laurencin, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3 (2007) 301.
- [215] M.K. Rai, S.D. Deshmukh, A.P. Ingle, A.K. Gade, *Journal of Applied Microbiology*, 112 (2012) 841.
- [216] K. Chaloupka, Y. Malam, A.M. Seifalian, *Trends in Biotechnology*, 28 (2010) 580.
- [217] L.J. Wilkinson, R.J. White, J.K. Chipman, *Journal of Wound Care*, 20 (2011) 543.
- [218] X.-Q. Wang, O. Kravchuk, R.M. Kimble, *Burns*, 36 (2010) 680.
- [219] V.K.M. Poon, A. Burd, *Burns*, 30 (2004) 140.
- [220] C. Zanette, M. Pelin, M. Crosera, G. Adami, M. Bovenzi, F.F. Larese, C. Florio, *Toxicology in Vitro*, 25 (2011) 1053.
- [221] R. Foldbjerg, D.A. Dang, H. Autrup, *Archives of Toxicology*, 85 (2011) 743.
- [222] P.V. AshaRani, G.L.K. Mun, M.P. Hande, S. Valiyaveetil, *Acs Nano*, 3 (2009) 279.
- [223] S. Hackenberg, A. Scherzed, M. Kessler, S. Hummel, A. Technau, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, R. Hagen, N. Kleinsasser, *Toxicology Letters*, 201 (2011) 27.
- [224] C. Tonello, B. Zavan, R. Cortivo, P. Brun, S. Panfilo, G. Abatangelo, *Biomaterials*, 24 (2003) 1205.
- [225] C. Tonello, V. Vindigni, B. Zavan, S. Abatangelo, G. Abatangelo, P. Brun, R. Cortivo, *Faseb Journal*, 19 (2005) 1546.
- [226] M. Kempf, R.M. Kimble, L. Cuttle, *Burns*, 37 (2011) 994.
- [227] D.F. Du Toit, B.J. Page, *Journal of wound care*, 18 (2009) 383.
- [228] F. Uygur, O. Oencuel, R. Evinc, H. Diktas, A. Acar, E. Uelkuer, *Burns*, 35 (2009) 270.
- [229] J.B. Wright, K. Lam, A.G. Buret, M.E. Olson, R.E. Burrell, *Wound Repair and Regeneration*, 10 (2002) 141.
- [230] Y.S. Huang, X.L. Li, Z.J. Liao, G.A. Zhang, Q. Liu, J. Tang, Y.Z. Peng, X.S. Liu, Q.Z. Luo, *Burns*, 33 (2007) 161.
- [231] J.G. Rheinwald, H. Green, *Cell*, 6 (1975) 331.
- [232] F. Denizot, R. Lang, *Journal of Immunological Methods*, 89 (1986) 271.
- [233] A. Thaler, N. Heidari, B.G. Cox, H. Schneider, *Inorganica Chimica Acta*, 286 (1999) 160.
- [234] C. Murphy, *Transactions of the Nebraska Academy of Sciences*, XVIII (1991) 105.
- [235] Y. Chen, Z. Wang, M. Xu, X. Wang, R. Liu, Q. Liu, Z. Zhang, T. Xia, J. Zhao, G. Jiang, Y. Xu, S. Liu, *ACS Nano*, 8 (2014) 5813.
- [236] G. Gravante, A. Montone, *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 92 (2010) 118.
- [237] R.X. Xu, in: S. Xia (Ed.), *Burns Regenerative Medicine and Therapy*, Karger, Basel, 2004, p. 106.
- [238] S. Kim, J.E. Choi, J. Choi, K.-H. Chung, K. Park, J. Yi, D.-Y. Ryu, *Toxicology in Vitro*, 23 (2009) 1076.
- [239] C. Greulich, J. Diendorf, T. Simon, G. Eggeler, M. Eppe, M. Koeller, *Acta Biomaterialia*, 7 (2011).
- [240] D. Drescher, C. Giesen, H. Traub, U. Panne, J. Kneipp, N. Jakubowski, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 9684.
- [241] N. Hirokawa, G.S. Bloom, R.B. Vallee, *Journal of Cell Biology*, 101 (1985) 227.
- [242] E.H. Ball, S. Singer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79 (1982) 123.
- [243] H.C. Lee, P.H. Yin, C.Y. Lu, C.W. Chi, Y.H. Wei, *Biochemical Journal*, 348 (2000) 425.
- [244] S. Marchi, C. Giorgi, J.M. Suski, C. Agnoletto, A. Bononi, M. Bonora, E. De Marchi, S. Missiroli, S. Patergnani, F. Poletti, A. Rimessi, J. Duszynski, M.R. Wieckowski, P. Pinton, *Journal of signal transduction*, 2012 (2012) doi:10.1155/2012/329635.

- [245] H.R. Kim, M.J. Kim, S.Y. Lee, S.M. Oh, K.H. Chung, *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726 (2011) 129.
- [246] M.R. Ciriolo, P. Civitareale, M. Carri, A. De Martino, F. Galiazzo, G. Rotilio, *Journal of Biological Chemistry*, 269 (1994) 25783.
- [247] A.B.G. Lansdown, *Current problems in dermatology*, 33 (2006) doi: 10.1155/2010/910686.
- [248] L. Jonas, C. Bloch, R. Zimmermann, V. Stadie, G.E. Gross, S.G. Schäd, *Ultrastructural pathology*, 31 (2007) 379.
- [249] M. Walker, D. Parsons, *International wound journal* 11 (2012) 496.
- [250] H. Tapiero, K.D. Tew, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57 (2003) 399.
- [251] J.M. Berg, Y.G. Shi, *Science*, 271 (1996) 1081.
- [252] S. Barve, C.J. McClain, *Trace Elements in Man and Animals--9: Proceedings of the Ninth International Symposium on Trace Elements on Man and Animals*, NRC Research Press, 1997, p. 224.
- [253] J.R. Schwartz, R.G. Marsh, Z.D. Draelos, *Dermatologic Surgery*, 31 (2005) 837.
- [254] A.B.G. Lansdown, U. Mirastschijski, N. Stubbs, E. Scanlon, M.S. Agren, *Wound Repair and Regeneration*, 15 (2007) 2.
- [255] R.E. Russo, X.L. Mao, H.C. Liu, J. Gonzalez, S.S. Mao, *Talanta*, 57 (2002) 425.
- [256] J. Koch, D. Gunther, *Applied Spectroscopy*, 65 (2011) 155A.
- [257] H.I. Labouta, M. Schneider, *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 9 (2013) 39.
- [258] C. Bianco, G. Adami, M. Crosera, F. Larese, S. Casarin, C. Castagnoli, M. Stella, G. Maina, *Burns*, 40 (2014) 1390.
- [259] L.W. Zhang, N.A. Monteiro-Riviere, *Skin Pharmacology and Physiology*, 21 (2008) 166.
- [260] F.F. Larese, F. D'Agostin, M. Crosera, G. Adami, N. Renzi, M. Bovenzi, G. Maina, *Toxicology*, 255 (2009) 33.
- [261] K. Loeschner, N. Hadrup, K. Qvortrup, A. Larsen, X. Gao, U. Vogel, A. Mortensen, H.R. Lam, E.H. Larsen, *Particle and Fibre Toxicology*, 8 (2011) doi: 10.1186/1743-8977-8-18.
- [262] C.J. Coombs, A.T. Wan, J.P. Masterton, R.A.J. Conyers, J. Pedersen, Y.T. Chia, *Burns*, 18 (1992) 179.
- [263] H.R. Moghimi, B.S. Makhmalzadeh, A. Manafi, *Burns*, 35 (2009) 1165.
- [264] R. Behra, L. Sigg, M.J.D. Clift, F. Herzog, M. Minghetti, B. Johnston, A. Petri-Fink, B. Rothen-Rutishauser, *Journal of the Royal Society Interface*, 10 (2013) 15.
- [265] M. Konige, H. Wang, C. Sztalryd, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1842 (2014) 393.
- [266] H. Chen, A. Dorrigan, S. Saad, D.J. Hare, M.B. Cortie, S.M. Valenzuela, *Plos One*, 8 (2013) doi:10.1371/journal.pone.0058208.
- [267] X.Q. Wang, H.E. Chang, R. Francis, H. Olszowy, P.Y. Liu, M. Kempf, L. Cuttle, O. Kravchuk, G.E. Phillips, R.M. Kimble, *Journal of Cutaneous Pathology*, 36 (2009) 788.
- [268] X.-Q. Wang, M. Kempf, J. Mott, H.-E. Chang, R. Francis, P.-Y. Liu, L. Cuttle, H. Olszowy, O. Kravchuk, J. Mill, R.M. Kimble, *Journal of Burn Care & Research*, 30 (2009).
- [269] A. Hebeish, M.H. El-Rafie, M.A. El-Sheikh, A.A. Seleem, M.E. El-Naggar, *International Journal of Biological Macromolecules*, 65 (2014) 509.
- [270] O. Strand, L. San Miguel, S. Rowan, A. Sahlqvist, *Annals of burns and fire disasters*, 23 (2010) 182.
- [271] K. Dunn, V. Edwards-Jones, *Burns*, 30 (2004) S1.
- [272] M. Marazzi, A. De Angelis, A. Ravizza, M.N. Ordanini, L. Falcone, A. Chiaratti, F. Crovato, D. Calo, S. Veronese, V. Rapisarda, *International wound journal*, 4 (2007) 8.

Publicazioni e partecipazioni a congressi

ARTICOLI DI RICERCA

Roman M., **Rigo C.**, Munivrana I., Vindigni V., Azzena B., Barbante C., Fenzi F., Guerriero P., Cairns W.R.L. Development and application of methods for the determination of silver in polymeric dressings used for the care of burns. 2013 Talanta (115), p 94-103

Rigo C., Ferroni L., Tocco I., Roman M., Munivrana I., Gardin C., Cairns W.R.L., Vindigni V., Azzena B., Barbante C., Zavan B. Active Silver Nanoparticles for Wound Healing. 2013 International journal of molecular sciences, p 4817-4840

Rigo C., Roman M., Munivrana I., Vindigni V., Azzena B., Barbante C., Cairns W.R.L. Characterization and evaluation of silver release from four different dressings used in burns care. 2012 Burns (38) p 1131–1142

Bressan E., Ferroni L., Gardin C., **Rigo C.**, Stocchero M., Vindigni V., Cairns W., Zavan B. Silver Nanoparticles and Mitochondrial Interaction. 2013 International journal of dentistry, p 1-8

CAPITOLI DI LIBRI

Gardin C., Ferroni L., Lancerotto L., Vindigni V., **Rigo C.**, Roman M., Cairns W., Zavan B. Nano-Therapies for Healing of Wounds and Ulcers in Nanomedicine in drug delivery Routledge, Taylor and Francis Group; ISBN 978-1-46-650616-9, p143-186

COMUNICAZIONI ORALI PERSONALI A CONGRESSI

31 Agosto-4 Settembre 2014,

17th BNASS7TraceSpec, Aberdeen, Scozia, Regno Unito

Titolo "Silver distribution in skin during wound healing", autori **C. Rigo**, D. S. Urgast, B. Spence, E. Kohlscheen, M. Roman, V. Vindigni, C. Barbante, J. Feldmann, W.R.L. Cairns

8-11 Luglio 2014

European Workshop on Laser Ablation, Royal Holloway University, Londra, Regno Unito

Titolo "Wound healing and LA-ICP-MS: a useful tool to evaluate silver distribution in skin during application of AgNPs dressing" autori **C. Rigo**, D. S. Urgast, B. Spence, E. Kohlscheen, M. Roman, V. Vindigni, C. Barbante, J. Feldmann, W.R.L. Cairns

7 Luglio 2014

Developments & Methodology in Laser Ablation ICP-MS, Cetac Teledyne User Meeting, Cambridge, Regno Unito

Titolo "Methodology for bioimaging silver nanoparticles in treated skin biopsies" autori **C. Rigo**

10-15 Febbraio 2013

European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2013, Cracovia, Polonia

Titolo "Chemistry of silver nanoparticles in burns healing: from in vitro to in vivo by ICP-MS" autori **C. Rigo**, W. R. L. Cairns, L. Ferroni, B. Zavan, M. Roman, C. Barbante, V. Vindigni, I. Munivrana, B. Azzena.

PRESENTAZIONI POSTER A CONGRESSI

10 - 11 Settembre 2013

Nanomedicine School 2013, Trieste, Italia

Titolo "New frontiers in burn healing: investigation of the chemistry and distribution of silver nanoparticles"

autori **C. Rigo**, M. Roman, V. Vindigni, B. Azzena, C. Barbante , W.R.L. Cairns.

Ringraziamenti

Il primo e più sentito ringraziamento va al mio tutor, Warren, che ha sempre creduto in me e che mi ha dato la possibilità di svolgere questo dottorato. In questi tre anni (beh, diciamo pure sette anni) mi ha insegnato, con non pochi scontri, che cosa è un ICP-MS, come si scrive un articolo scientifico, un capitolo di libro, come si risponde a un referee, e soprattutto come non si deve rispondere a un referee.

Mi ha dato la possibilità di presentare il mio lavoro in conferenze internazionali e mi ha permesso di conoscere altri ricercatori europei che hanno partecipato e forse saranno con me nel mio cammino lungo la strada della scienza. Grazie anche per aver aspettato che avessi imparato come si fa una presentazione semestrale senza aggredire l'intero collegio di dottorato prima di cedermi il palco in contesti internazionali.

Un ringraziamento speciale va al Prof. Cescon e al Prof. Barbante per avermi accolta nel gruppo di ricerca di chimica analitica ambientale e per avermi dato la possibilità di muovere i miei primi passi nel mondo della ricerca scientifica.

Grazie anche al Prof. Feldmann dell'Università di Aberdeen per avermi ospitata nel suo gruppo durante il mio periodo di ricerca all'estero, e grazie nuovamente a Warren per aver reso possibile questa avventura scozzese. So che ti è costato molto sfidare Jörg a chi beve più birra la sera dell'*Agilent social event* durante la *Winter Conference* a Cracovia: i postumi si sono fatti sentire per giorni! E non riveleremo mai il numero di pinte a cui si è fermata la sfida.

Grazie a Bill, Adam, Nick, Dhinesh e Steve della Teledyne Cetac Technologies per aver inviato un'unità laser ablation a Venezia, avermi supportata dal punto di vista tecnico - metodologico durante le analisi ed aver sponsorizzato economicamente la mia partecipazione sia al LA-ICP-MS *user meeting* sia al EWLA lo scorso luglio.

Un ringraziamento va a Marco, o come lo chiamo di solito, il dr. Roman, con il quale ho condiviso la realizzazione di questo progetto.

Un grazie di cuore alla mia squadra di amici, che mi hanno aiutata, sostenuta, supportata e sopportata in questi anni e in questi ultimi mesi, sicuramente i più duri sotto molti aspetti.

In ordine casuale, Barbarella, Saretta, Stefano, Enrico, Fabio, Sarah, (zia)Angela, Elena A e Marco V, Giovanni, Clara, Marco, Roberta e Rossano. Questa tesi non avrebbe visto la luce senza le deviazioni alcoliche con Barbarella, le lunghe telefonate e le notti a casa di Saretta dalla quale mi rifugiavo nei momenti più felici e più difficili. Grazie anche a (zia)Angela per aver condiviso con me tanti giorni in *clean room* e per avermi fatto trovare sempre la porta del tuo

studio aperta ogni volta che avevo bisogno di un posto sicuro dove ritrovare me stessa. Nel concludere questa tesi, fondamentali si sono rivelate le mattine di agosto in laboratorio passate a mangiare patatine e a bere coca cola con Enrico, o le conversazioni via sms con Fabio alle prime luci dell'alba in questa strana e caotica estate. Grazie a Sarah per esserci stata nel modo discreto e riservato che la contraddistingue, e per aver difeso strenuamente la mia privacy in più occasioni. Lo ho apprezzato molto. Ringrazio Rossano per aver condiviso con me tante cose: pensieri, idee, commenti, opinioni, pareri scientifici e non, il viaggio dalla stazione all'università al mattino e in alcuni casi anche il suo studio. Tutte le volte che hai lasciato incustodita la scrivania, mi sono appropriata della zona per provare e riprovare fino allo sfinimento le mie presentazioni. Grazie a Stefano, il primo che ho conosciuto in questo gruppo e con il quale ormai mi intendo anche senza parlare. Grazie perchè ogni volta che gli esperimenti andavano male, e dovevo fermarmi in università fino alla chiusura, tu restavi con me a farmi compagnia e a controllare che mi ricordassi di uscire dal laboratorio. Grazie a tutti quelli che si sono avvicinati in laboratorio e in ufficio (Giovanni, Clara, Roberta, Torben, Fabiana..) e che hanno condiviso con me i momenti di entusiasmo, quelli di sconforto e le grandi feste che abbiamo organizzato in questi anni. In riferimento a questo, una menzione d'onore va al comitato organizzatore feste e in particolare a Elena. Un grazie speciale va Marco, che è arrivato in un pomeriggio di metà settembre, nel momento più impegnativo tra tutti, quando ormai le forze erano finite. Grazie perché ogni volta che ero in difficoltà ti ho trovato, e se sono riuscita a terminare questo lavoro è anche merito tuo. Grazie per tutte le volte che, dicendomi "forza che tra poco è finita. Avanti, collega, che manca poco", mi hai ricordato che il traguardo era sempre più vicino e che non ero da sola in questa corsa.

Grazie a mio nonno che ha sempre tifato per me e che è stato il primo, e per un lungo periodo l'unico, a sapere che avevo accettato di intraprendere questo percorso. Grazie per avermi sempre appoggiata e sostenuta con il tuo entusiasmo. So che ora saresti orgoglioso di me. E sono certa che in tanti momenti, hai fatto in modo che le situazioni prendessero una piega particolare.

Grazie a mamma che mi ha trasmesso l'amore per la scienza e per la ricerca. Continuerò anche per te. Porterò avanti il sogno di entrambe.

Grazie a Teo e grazie a papà.

Un grazie speciale va al Prof. Selva e a tutti i docenti del collegio di dottorato per aver condiviso con me, semestre dopo semestre, i progressi della mia ricerca. Grazie anche a Francesca, sempre gentile, preparata e precisa nel chiarire tutti i miei dubbi burocratici.

Infine, come per ogni lavoro *“This research was supported by funds from the MIUR-FIRB project, number RBFRO8M6W8. ELGA LabWater is acknowledged for providing the PURELAB Option-Q and Ultra Analytic systems, which produced the ultra-pure water used for Ag determinations”*.

Estratto per riassunto della tesi di dottorato

L'estratto (max. 1000 battute) deve essere redatto sia in lingua italiana che in lingua inglese e nella lingua straniera eventualmente indicata dal Collegio dei docenti.

L'estratto va firmato e rilegato come ultimo foglio della tesi.

Studente: Chiara Rigo matricola: 955936

Dottorato: Scienze Chimiche

Ciclo: XXVII

Titolo della tesi¹ : Studio *in vivo* e *in vitro* delle nuove applicazione dell'argento per il trattamento delle ferite

Abstract:

Per centinaia di anni l'argento è stato utilizzato per le sue proprietà antibatteriche nel trattamento di ulcere, ferite croniche, ferite e ustioni. Recentemente, a causa della comparsa di ceppi batterici resistenti agli antibiotici, si è assistito ad un rinnovato interesse per l'uso dell'argento nel trattamento delle lesioni cutanee. A partire dagli anni novanta sono state messe in commercio diverse medicazioni contenenti argento che trovano ora ampio utilizzo presso i centri ustione di tutto il mondo.

Le medicazioni sono generalmente costituite da una struttura polimerica impregnata con argento metallico in forma di nanoparticelle, o con sali d'argento. In questo lavoro è stata caratterizzata mediante analisi SEM-EDS la struttura e la specie di argento presente in diverse medicazioni comunemente utilizzate presso il Centro Ustioni di Padova. Sono stati sviluppati metodi di mineralizzazione per determinare il contenuto di argento nei diversi prodotti e mediante analisi ICP-MS è stato valutato il rilascio di argento in diverse soluzioni di crescente complessità ed in grado di simulare l'ambiente chimico di una ferita. La ricerca si è poi focalizzata sulla valutazione della sicurezza nell'uso di un prodotto contenente nanoparticelle di argento: è stata studiata la citotossicità in colture cellulari tridimensionali di fibroblasti umani. Per la prima volta è stato possibile determinare il profilo di concentrazione dell'argento in biopsie cutanee prelevate da pazienti ustionati trattati con

¹ Il titolo deve essere quello definitivo, uguale a quello che risulta stampato sulla copertina dell'elaborato consegnato.

questo prodotto e attraverso analisi TEM è stata studiata la localizzazione subcellulare delle nanoparticelle di argento rilasciate dalla medicazione durante la sua applicazione.

Ulteriori biopsie cutanee sono state prelevate da pazienti ustionati durante il trattamento con nanoparticelle di argento e attraverso analisi di LA-ICP-MS è stato possibile mappare la distribuzione dell'argento nella pelle. I risultati di questo lavoro hanno permesso di chiarire quale sia il destino dell'argento una volta che questo viene rilasciato dalla medicazione e la modalità con cui questo elemento viene assorbito e distribuito nel corpo umano.

English version

For centuries silver (Ag) has been extensively used for its antimicrobial properties to treat ulcers, chronic wounds and burns. Recently the interest in using silver to heal wounds has increased due to the rise of antibiotic resistant bacteria. Several different silver dressings have now been commercialized and are widely used in burns centers. The dressings are typically composed of a polymeric scaffold impregnated with silver in the ionic form or as metallic nanoparticles (AgNPs). In this work some dressings commonly used in the Burn Center of Padua have been characterized by SEM-EDS analysis to determine their structure and the Ag species. Different mineralization methods were developed to determine the total silver concentration in the products by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS).

After chemical characterization, we assessed the kinetics of silver release in different matrices of increasing complexity that could represent the possible chemical environments in which the silver can act during the routine application of the dressings.

From the second year of the project, the research was focused on evaluating the behavior and safety of AgNPs for burns patients. Experiments on a three dimensional cell culture system of human skin fibroblasts were conducted to study the cytotoxicity of the AgNPs. Skin biopsies were collected from a burns patient treated with a AgNPs dressing. Electron microscopy analyses were carried out to determine the Ag NPs subcellular localization in these samples. The silver concentration depth profile was determined in duplicates of these samples. Using LA-ICP-MS analysis it was possible to study the Ag spatial distribution and Ag maps were obtained for several skin biopsies collected from burn patients treated with a AgNPs dressing. The results shed light on the ways in which Ag is adsorbed and re-distributed to the organs and

to the whole body, and allowed us to clarify the fate of AgNPs after they have been released onto the dermis.

Firma dello studente

Giara Ripa
