

# Indice

1. Abstract.....	3
2. Introduzione .....	4
2.1 Microcristalli .....	5
2.2 Preparazione dei campioni e procedure analitiche.....	10
2.3 Scopi del lavoro .....	13
3. Metodi sperimentali.....	14
3.1 Microscopia ottica.....	14
3.2 Microscopia elettronica a scansione.....	17
3.3 Spettroscopia vibrazionale micro-Raman .....	22
3.4 Diffrazione a raggi X da polveri.....	29
3.4.1 Micro-diffrazione a raggi X da polveri .....	35
4. Materiali analizzati e trattamento delle campionature .....	37
4.1 Il liquido sinoviale.....	37
4.2 Artrocentesi e pratica clinica .....	41
4.2.1 Definizione di artrocentesi.....	41
4.2.2 Le indicazioni all'artrocentesi .....	42
4.2.3 Procedura dell'artrocentesi .....	43
4.3 Trattamento delle campionature .....	45
5. Risultati e discussioni .....	51
5.1 Campione "7.4.15" .....	51
5.2 Campione "GAL" .....	58
5.3 Campione "BUS" .....	65
5.4 Campione "GIB" .....	69
5.5 Campione "PFCD" .....	74
5.6 Campione "1MN" .....	81
5.7 Campione "2PAM" .....	84
5.8 Campione "3PIZ" .....	89
5.9 Campione "4CPP" .....	92

5.10 Campione "P1" .....	95
5.11 Campioni "OA59PELLET" e "BD" .....	101
6. Conclusioni .....	103
7. Appendice.....	107
8. Referenze.....	108
9. Ringraziamenti .....	113

## 1. Abstract

The presence of particles and crystals in synovial fluid, easily recognizable under optical microscope, is a common feature in patients with various types of rheumatic disorders.

Some crystals, such as monosodium urate (MSU), calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) and basic calcium phosphate (BCP), are certainly linked to specific disease (as gout, chondrocalcinosis and inflammatory osteoarthritis).

In clinical practice, crystals identification is based on synovial fluid analysis made by optical microscopy in transmitted polarized light, which represents an effective outpatient procedure, relatively simple and cheap. The main disadvantages of this technique are the lack of specificity and the presence of other crystals or particles of different nature, that can create difficulties of interpretation.

Almost all synovial fluid samples studied during this thesis was extracted from knee joint by arthrocentesis. Then, all samples were diluted and centrifuged in order to obtain a small amounts of crystals from the liquid, that was fixed on a suitable holder.

The next step consists in synovial fluid crystals analysis by analytical techniques commonly used by geologists in the mineralogical, petrological and crystallographic fields, in order to understand their specific role in the development of the rheumatic diseases. The samples were analyzed by optical microscopy in transmitted polarized light (OM), scanning electron microscopy (SEM) equipped with EDS (chemical analysis), micro-Raman spectroscopy, X-ray powder diffraction (XRPD) and X-ray micro-diffraction (XRSC).

The multi-analytical approach applied during this thesis represents a new analytical tool that will become useful to study in a very specific way crystals involved in rheumatic disorders.

## 2. Introduzione

Le malattie reumatiche, tra le quali gotta e osteoartrite rappresentano solo le più note, sono considerate tra le più comuni e diffuse patologie articolari, principale causa di dolore cronico e disabilità negli anziani, e vengono affrontate su scala globale come un serio ed oneroso problema riguardante la salute pubblica (*Goldring M. B. et al., 2007*).

Il liquido sinoviale, in condizioni normali, riempie la cavità articolare (come ad esempio quella del ginocchio) in quantità molto ridotta (fino a un massimo di circa 4ml).

In pazienti affetti da disturbi reumatici di varia natura si riscontra comunemente nel liquido sinoviale, considerevolmente aumentato in quantità, la presenza di cristalli facilmente osservabili al microscopio ottico (*Pascual E. et al, 2005*).

Nella pratica clinica l'identificazione dei cristalli è basata sull'analisi del liquido sinoviale effettuata al microscopio ottico in luce trasmessa polarizzata, che rappresenta una procedura ambulatoriale efficace, relativamente semplice ed economica (*Oliviero F., 2005*). Il principale svantaggio di questa tecnica, però, è la mancanza di specificità che può essere in parte attribuibile ad errori di interpretazione dell'osservatore. D'altra parte il liquido sinoviale può contenere uno svariato numero di altri cristalli (come colesterolo, ossalati, corticosteroidi, lipidi, ecc.) ed altre particelle di diversa natura (tra cui diversi tipi di cellule, emoglobina, fibrina, amido, polvere, ecc.), che in microscopia ottica possono generare difficoltà interpretative anche rilevanti.

Alcuni tipi di cristalli tra i più frequentemente riconosciuti, come l'*urato monosodico* (MSU), il *pirofosfato di calcio diidrato* (CPPD o CPP) e il *fosfato basico di calcio* (BCP), da tempo oggetto di studio ed è stato dimostrato il loro diretto legame con specifiche malattie (rispettivamente: artrite gottosa; pseudogotta, condrocalcosi articolare, poliartrite; periartrite calcifica, osteoartrite infiammatoria, infiammazioni dei tessuti molli) (*Yavorsky A. et al.,*

2008). È stato osservato che essi correlano con la gravità della malattia e vengono riscontrati anche durante gli stadi iniziali della malattia. Per quanto riguarda il loro ruolo nella fase infiammatoria, è stato inoltre accertato che nella condrocalcosi la crescita di cristalli di pirofosfato di calcio diidrato causa la rottura della membrana dei lisosomi (organelli adibiti alla digestione di molecole estranee ingerite dalla cellula), provocando la fuoriuscita degli enzimi digestivi presenti nei lisosomi stessi, i quali attaccano i globuli bianchi, incrementando così l'infiammazione (Mandel N. S., 1975).

Tuttavia, più in generale, il significato della presenza dei cristalli nei liquidi sinoviali, i meccanismi che ne regolano la formazione e il loro ruolo nell'evoluzione della patologia non sono ancora del tutto chiariti e dunque la loro corretta individuazione e identificazione rappresenta un passo fondamentale per la diagnosi precoce e corretta delle diverse malattie correlate e per una gestione ottimale dei pazienti.

## 2.1 Microcristalli

Le due fasi cristalline più importanti, che non sono normalmente presenti nell'articolazione, ma che risultano indice di malattia sono l'*urato monosodico* e il *pirofosfato di calcio diidrato* (Oliviero F., 2012). Attraverso il rinvenimento di queste due fasi cristalline intrinseche (cioè formate all'interno dell'articolazione), è possibile fornire una diagnosi rispettivamente di gotta e condrocalcosi articolare (o pseudogotta) (Jaovisidha K. et al., 2002 e Gibilisco P. et al., 2009). Cristalli di *fosfato basico di calcio* sono talora riscontrabili in liquidi sinoviali patologici pur non dimostrando una particolare specificità.

Di seguito vengono elencati e descritti brevemente i principali tipi di cristalli che si rinvenono in liquidi sinoviali di articolazioni in stato di malattia.

➤ Urato monosodico (MSU)

I cristalli di urato monosodico ( $\text{NaC}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3$ ) hanno una caratteristica forma aciculare, con una lunghezza che può raggiungere e superare i 40  $\mu\text{m}$ , ma aventi spessori assai esigui (Figura 1).

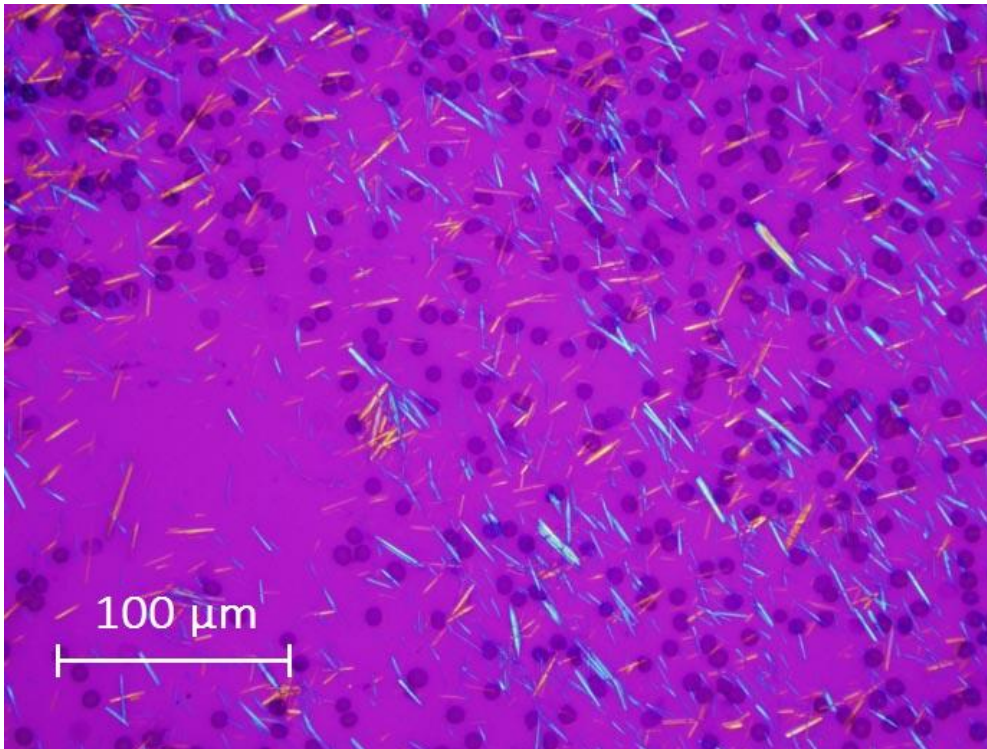


Figura 1: cristalli di urato monosodico osservati al microscopio ottico polarizzatore con il compensatore inserito (fonte: emlyceum.com).

Spesso sono intrappolati in maglie di fibrina, in frammenti di cartilagine o si possono creare agglomerati sotto forma di ammassi tofacei. Alla luce polarizzata a nicols incrociati appaiono bianchi lucenti, mentre con l'ausilio del compensatore rosso di primo ordine presentano una forte birifrangenza negativa con colori vivaci, tra il giallo e l'azzurro. La presenza di cristalli di urato monosodico nel liquido sinoviale permette una diagnosi certa di gotta.

➤ Pirofosfato di calcio diidrato (CPPD)

I cristalli di pirofosfato di calcio diidrato ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) sono di forma generalmente prismatica più o meno allungata con dimensione massima che può raggiungere i 20  $\mu\text{m}$  (Figura 2). Al microscopio ottico a luce polarizzata appaiono bianchi, ma meno luminosi dei cristalli di urato monosodico, e, con il compensatore inserito, presentano una debole birifrangenza positiva, anche se quando hanno dimensioni molto ridotte non esibiscono cambiamenti di colore.

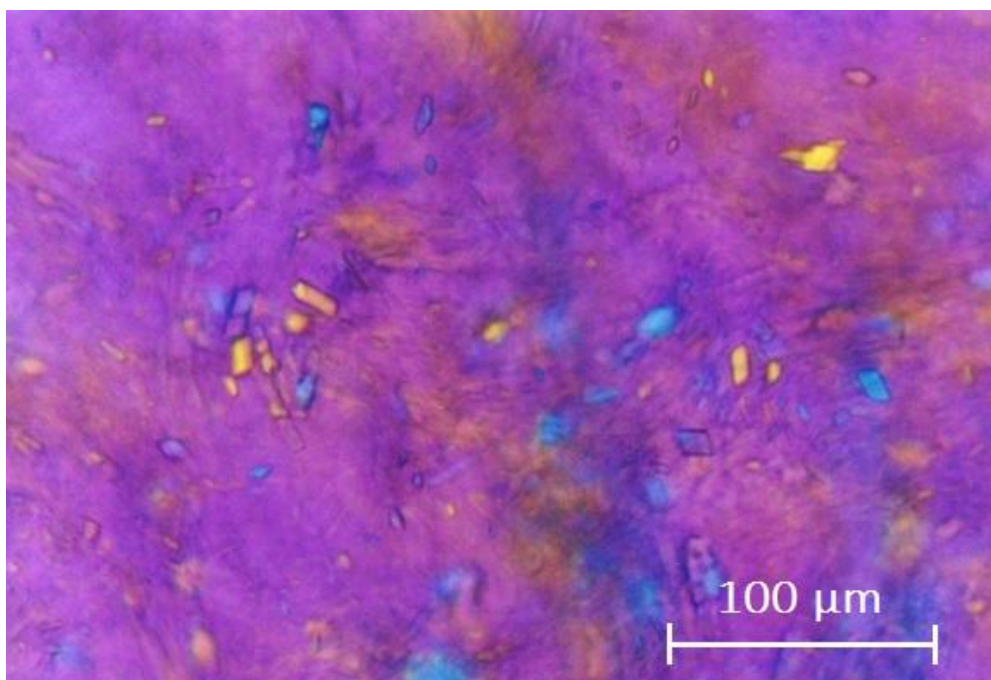


Figura 2: cristalli di pirofosfato di calcio diidrato osservati al microscopio ottico polarizzatore con il compensatore inserito.

A causa della loro forma possono talvolta venire confusi con altro particolato del liquido sinoviale, come l'ossalato di calcio e i cortisonici.

Il pirofosfato di calcio diidrato si presenta principalmente secondo due simmetrie: triclina e monoclina, abbreviate rispettivamente come t-CPPD e m-CPPD, tra le quali la seconda è più diffusa nei casi maggiormente infiammatori (Aigner T. et al., 2007); oltre a queste esiste una forma di

pirofosfato di calcio tetraidrato (m-CPPT), che presenta due configurazioni polimorfiche denominate m-CPPT $\alpha$  e m-CPPT $\beta$ . Durante lo studio di questi cristalli è stata inoltre determinata la struttura cristallina per t-CPPD (*Mandel N. S., 1975*) e m-CPPT.

Il rinvenimento di CPPD nel liquido sinoviale non fornisce una chiara interpretazione sul piano clinico e patologico come invece accade con il ritrovamento di cristalli di urato monosodico. Se i cristalli di CPPD si rinvenivano in un liquido sinoviale infiammatorio ci sono molte possibilità che si tratti di una forma acuta di artropatia, la condrocalcosi o "pseudogotta". Quando, invece, i cristalli sono presenti in un liquido sinoviale poco infiammatorio si hanno due possibilità: una è che possa trattarsi della fase "intercritica" di un attacco di condrocalcosi, l'altra è che si sia in presenza di una forma cronica di artropatia da CPPD. Tuttavia, il ritrovamento di questi cristalli risulta ancora dibattuto, sebbene, soprattutto in casi di pazienti anziani, pare che la loro presenza possa derivare dalla diminuita capacità della cartilagine invecchiata o degenerata di sfavorirne la deposizione (*Punzi L. et al., 2010*).

➤ Fosfato basico di calcio (BCP)

Il termine "fosfato basico di calcio" è genericamente utilizzato per descrivere diverse fasi cristallograficamente e chimicamente distinte, raggruppate in agglomerati e tra le quali si distinguono l'idrossiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), l'octacalcio fosfato ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e il tricalcio fosfato ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (*Swan A. et al., 1994*). Sono cristalli estremamente piccoli, di dimensioni sempre inferiori a 1 $\mu\text{m}$  (da 20 a 100 nm) e si aggregano nel liquido sinoviale per formare degli ammassi di circa 5-20  $\mu\text{m}$ , che appaiono come agglomerati non birifrangenti al microscopio a luce polarizzata. La differenziazione tra le diverse fasi non è possibile nemmeno attraverso la microscopia elettronica a

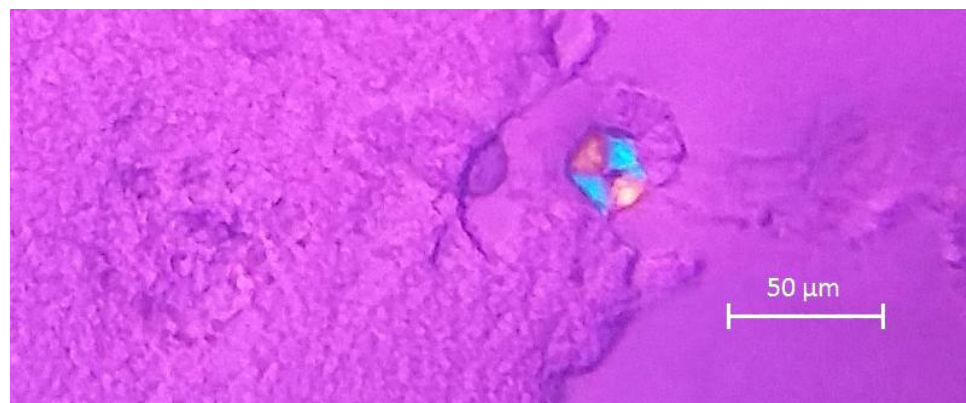


scansione (SEM) o la spettroscopia vibrazionale Raman, ma solo attraverso metodologie analitiche di maggior risoluzione come la microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

➤ Altro

Altri cristalli e particelle di varia natura possono essere rinvenuti nel liquido sinoviale. Il loro aspetto e l'eventuale birifrangenza possono indurre ad errori interpretativi. Tra i più comuni:

- *Fibrina e frammenti di cartilagine*: entrambi si presentano non birifrangenti al microscopio a luce polarizzata; le fibrille di fibrina spesso intrappolano i cristalli di CPPD e di MSU.
- *Colesterolo*: hanno una caratteristica forma a placche quadrate o rettangolari con un angolo dentellato; alla luce polarizzata esibiscono una debole birifrangenza.
- *Lipidi*: cristalli sferici, con diametro da 1 a 20  $\mu\text{m}$ , al microscopio a luce polarizzata presentano una forte birifrangenza positiva e la classica "croce di Malta", un esempio è riportato in [Figura 3](#).



**Figura 3:** cristallo di lipide (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).

- *Ossalati di calcio*: presentano frequentemente le caratteristiche forme bipiramidale, a “covone” o a “chicco di riso” e hanno una dimensione che varia da 5 a 30  $\mu\text{m}$ , alla luce polarizzata e compensata sono positivamente birifrangenti.
- *Corticosteroidi*: sono fortemente birifrangenti, ma differiscono l’uno dall’altro per le dimensioni e l’aspetto generale.
- *Polvere e fibre*: costituiscono i contaminanti più comuni, entrambi al microscopio a luce polarizzata possono apparire birifrangenti (Figura 4).



Figura 4: fibre (contaminanti); immagine al microscopio polarizzatore con compensatore.

## 2.2 Preparazione dei campioni e procedure analitiche

La maggior parte dei campioni di liquido studiati è stata estratta dall’articolazione del ginocchio mediante artrocentesi e i cristalli in essi contenuti sono stati identificati perlopiù come pirofosfati di calcio; un solo campione, invece, proviene dalla porzione dell’avampiede affetto da gotta ed è ricco in cristalli di urato monosodico. Tutti i campioni di liquido sinoviale sono stati diluiti e centrifugati per ottenere un concentrato di cristalli da collocare su un supporto idoneo e venire poi analizzati.

Come fase successiva alla preparazione dei campioni si è proseguito con l'analisi dei cristalli attraverso l'ausilio di diverse tecniche analitiche, quali: *microscopia ottica a luce trasmessa polarizzata*, *microscopia elettronica a scansione (SEM) con microanalisi (spettrometria EDS)*, *spettroscopia vibrazionale micro-Raman*, *diffrazione a raggi X delle polveri (XRPD)*, *micro-diffrazione a raggi X delle polveri*. Per ognuna delle suddette tecniche analitiche vengono comunemente utilizzati supporti portacampioni costruiti in materiali tali da interferire il meno possibile durante l'intero processo di analisi. Nel caso dei campioni di liquido sinoviale (minimi quantitativi da analizzare in successione con le diverse tecniche) si è cercato di individuare un unico supporto, su cui deporre e far asciugare il campione liquido, e di un materiale che determinasse la minima interferenza nel suo uso con le diverse tecniche analitiche, ossia: trasparente e non birfrangente al microscopio ottico a luce trasmessa, con un basso indice di assorbimento e trasparente alla radiazione X, e che non producesse, quando irraggiato dal fascio incidente, un segnale tale da disturbare eccessivamente quello prodotto dal campione in esame.

Di seguito vengono esposte brevemente le metodologie analitiche utilizzate:

- *Microscopia ottica a luce trasmessa polarizzata*: è lo strumento utilizzato nella comune pratica clinica per l'identificazione dei cristalli; ad esso viene associato l'uso di compensatori e tecniche di colorazione (alizarina). Attraverso l'ausilio del microscopio ottico, però, è possibile soltanto discriminare le diverse tipologie di cristalli in modo non sempre preciso, osservandone la morfologia e le caratteristiche ottiche, senza alcuna specifica chimica e cristallografica.
- *Microscopia elettronica a scansione (SEM) con microanalisi (spettrometria EDS)*: questa tecnica permette l'osservazione ad elevatissimi ingrandimenti di singoli cristalli e di loro concentrati mediante elettroni secondari e retrodiffusi. Simultaneamente, la microanalisi EDS (Energy-Dispersive X-Ray

Spectroscopy) permette di verificare puntualmente la composizione chimica di ciascun cristallo, avendo una risoluzione spaziale dell'ordine del micron.

- *Spettroscopia vibrazionale micro – Raman*: la tecnica permette di ricavare informazioni sui modi vibrazionali delle molecole che compongono un materiale e riuscire quindi a caratterizzarlo con precisione attraverso un confronto con spettri standard. Attraverso l'ausilio di questa tecnica sono stati quindi ricavati degli spettri dei cristalli, successivamente analizzati e comparati con spettri noti per determinarne la natura.
- *Diffrazione a raggi X delle polveri (XRPD)*: per procedere all'analisi dei cristalli con l'ausilio del diffrattometro a raggi X delle polveri sono state depositate più gocce di liquido diluito e centrifugato su di un supporto in silicio metallico monocristallino (zero background) in modo da concentrare un quantitativo maggiore di cristalli. Il preparato è stato poi rimescolato per evitare l'orientazione preferenziale dei cristalli e analizzato.
- *Micro-diffrazione a raggi X delle polveri*: metodologia simile alla precedente, ma con la peculiarità di eseguire l'analisi su un quantitativo molto ridotto di aggregato cristallino (utilizzando tale tecnica si può studiare una quantità di materiale di circa 300-400 volte inferiore rispetto alla quantità utilizzata in diffrattometria a raggi X da polvere convenzionale). L'osservazione è stata condotta sia su un agglomerato di cristalli di urato monosodico, sia sullo stesso materiale analizzato attraverso la diffrattometria a raggi X delle polveri convenzionale.

I diffrattogrammi risultanti sono stati interpretati attraverso il confronto con pattern di diffrazione standard archiviati nel database PDF (powder diffraction file).

### 2.3 Scopi del lavoro

Lo scopo principale del presente lavoro tesi è la caratterizzazione dei cristalli presenti nel liquido sinoviale in condizioni patologiche mediante l'utilizzo di diverse metodologie analitiche solitamente impiegate in ambito mineralogico e cristallografico, ma inusuali in ambito medico. Tale lavoro si svolge in collaborazione con l'Unità di Reumatologia del Dipartimento di Medicina dell'Università di Padova, che in questa fase provvede principalmente a fornire i campioni di liquido sinoviale e si inserisce in un progetto di più ampio raggio in ambito medico e di salute pubblica, dal momento che, nonostante da tempo esista ampio interesse riguardo tali cristalli, ancora molte rimangono le questioni aperte relativamente alle cause e alle modalità con cui avviene la loro deposizione e in merito alla loro correlazione con le diverse fasi della malattia.

Proprio perché le malattie reumatiche colpiscono una grande porzione della popolazione mondiale, è importante approfondire le conoscenze sulla natura dei cristalli presenti nei liquidi sinoviali, che, insieme ad altri fattori biochimici, concorrono ad aumentare l'entità dell'infiammazione all'interno dell'articolazione colpita dalla malattia (*Landis R. C. et al., 2001*). L'approccio multi – metodologico, concretizzato durante questo lavoro di tesi, rappresenta quindi un nuovo metodo di analisi che può risultare estremamente utile a fornire un quadro più completo riguardo le fasi cristalline implicate nell'evoluzione delle diverse patologie reumatiche.

### 3. Metodi sperimentali

#### 3.1 Microscopia ottica

Il microscopio ottico polarizzatore a luce trasmessa (Figura 5) è uno strumento che sfrutta la luce polarizzata per l'osservazione di campioni sufficientemente sottili da poter essere attraversati dalla luce. Per luce polarizzata si intende un insieme di onde, anche di diverse frequenze, costrette a vibrare secondo un unico piano lungo la direzione di propagazione. La luce naturale, invece, oltre che oscillare su frequenze diverse, si muove su tutti i piani perpendicolari alla



Figura 5: microscopio ottico polarizzatore.

direzione di propagazione dell'onda luminosa. Quando la luce naturale viene fatta passare attraverso un filtro polarizzatore, quest'ultimo seleziona le onde in base al piano della loro vibrazione e ciò che risulta è un fascio composto da onde che vibrano solo su di un piano.

All'interno del microscopio ottico polarizzatore sono presenti due filtri che inducono la polarizzazione della luce:

l'analizzatore, collocato tra l'oculare e l'obiettivo, e il polarizzatore, posto tra la

sorgente di luce e il campione. Quando questi due elementi sono orientati a  $90^\circ$  l'uno rispetto all'altro il campo visivo appare totalmente nero, ossia "in estinzione". Tutto ciò risulta necessario per studiare le proprietà ottiche dei materiali osservati, quando questi presentano il fenomeno della birifrangenza. Tale proprietà è caratteristica di sostanze otticamente anisotrope che permettono lo sdoppiamento di un raggio incidente in due raggi rifratti, i quali si propagano a velocità diverse e sono polarizzati su due piani tra loro

perpendicolari. Quindi i materiali dotati di birifrangenza deviano la luce, polarizzata dal primo filtro, scindendola in due radiazioni; la radiazione emergente dall'oggetto giungerà al secondo filtro ruotata rispetto all'orientazione originaria: l'oggetto apparirà dunque visibile in un campo scuro.

Il microscopio ottico a luce polarizzata è largamente utilizzato in Geologia nell'ambito di studi mineralogico-petrografici, con lo scopo di identificare le fasi cristalline presenti all'interno di una roccia.

L'analisi si basa sull'osservazione del comportamento della luce quando attraversa sezioni sottili di rocce (Figura 6), ridotte allo spessore di 30  $\mu\text{m}$ , condizione per cui quasi

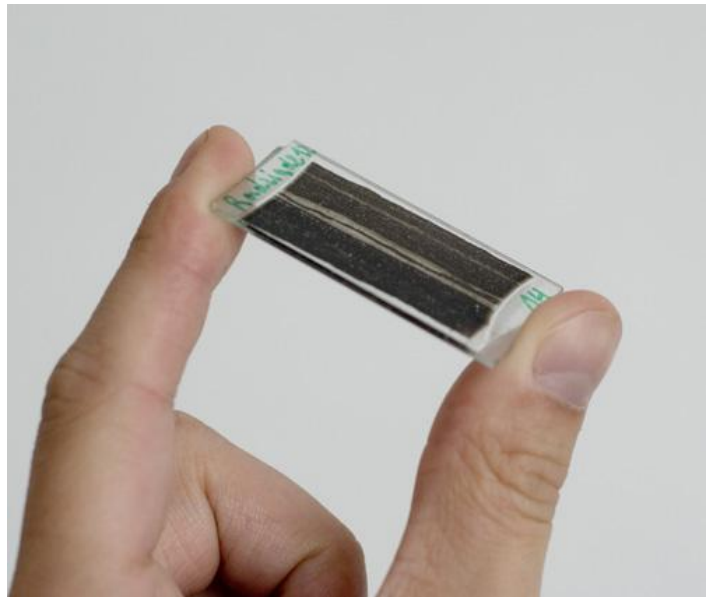


Figura 6: esempio di una sezione sottile di roccia utilizzata negli studi petrografici (fonte: [thin-section-preparation.com](http://thin-section-preparation.com)).

tutti i minerali si lasciano attraversare dalla luce. In

questo modo vengono di conseguenza studiate le proprietà di assorbimento e propagazione della luce nei cristalli, dipendenti dalla loro composizione, struttura e orientazione.

In ambito reumatologico il microscopio ottico polarizzatore è adoperato per condurre analisi di routine nella pratica clinica, in quanto è possibile distinguere i diversi tipi di cristalli che si possono trovare all'interno del liquido sinoviale di articolazioni in condizioni patologiche e dedurre in modo approssimativo la quantità di cristalli con dimensioni maggiori di 5 – 10  $\mu\text{m}$ . Durante questa pratica, utilizzata principalmente per distinguere i cristalli di CPPD e di MSU tra loro e da corpi secondari, un terzo elemento viene inserito tra il polarizzatore e

l'analizzatore, e orientato a  $45^\circ$  rispetto a questi, il compensatore (o lamina ausiliaria) a ritardo fisso "rosso di primo ordine", costituito da una sezione principale di quarzo tagliata con uno spessore di  $55 \mu\text{m}$ . Una volta inserita la lamina il campo del microscopio non appare più nero, ma rosso-rosato. I cristalli di CPPD e di MSU vengono riconosciuti a seconda della colorazione che esibiscono quando il loro asse di allungamento maggiore è parallelo all'asse ordinario del compensatore, viene cioè determinata l'orientazione della sezione ellittica dell'indicatrice ottica. Se un cristallo di CPPD è posto con l'asse di allungamento parallelo all'asse del compensatore esso appare blu, mentre se il cristallo viene ruotato di  $90^\circ$  assumerà una colorazione gialla: l'elongazione è positiva (condizione additiva), l'asse maggiore dell'ellisse dell'indicatrice ottica è parallelo all'asse di allungamento del cristallo. Per i cristalli di MSU avviene il contrario, se l'asse di allungamento del cristallo è parallelo all'asse del compensatore, appare giallo, mentre quando viene ruotato di  $90^\circ$  vira al blu: l'elongazione è negativa (condizione sottrattiva), l'asse maggiore dell'ellisse dell'indicatrice ottica è orientato perpendicolarmente all'asse di allungamento del cristallo.

Durante questo lavoro di Tesi il microscopio ottico a luce polarizzata è stato utilizzato soprattutto per individuare i cristalli di CPPD e MSU aventi morfologia e dimensioni idonee per essere poi sottoposti ad ulteriori analisi con l'ausilio di altre tecniche analitiche.

Il microscopio polarizzatore risulta essere lo strumento più accessibile ed economico per indagini cliniche frequenti, di semplice utilizzo senza richiedere conoscenze tecniche particolari e complesse. Non è però uno strumento che permette un'identificazione estremamente precisa, in quanto l'analisi è basata sulle caratteristiche morfologiche e di birifrangenza dei cristalli esaminati; necessita, inoltre, di un operatore esperto che sappia interpretare correttamente i campioni presi in esame. La tecnica permette quindi di distinguere i cristalli di



CPPD, MSU e i BCP tra loro e da altri composti secondari, senza però riuscire a determinarne caratteristiche più approfondite.

### 3.2 Microscopia elettronica a scansione

Il Microscopio Elettronico a Scansione (SEM), visibile in [Figura 7](#), è uno strumento elettro-ottico che, attraverso l'emissione di un fascio di elettroni, permette l'analisi dei diversi segnali generati dall'interazione tra il fascio elettronico stesso ed il campione preso in esame.



**Figura 7: microscopio elettronico a scansione (SEM) del Dipartimento di Geoscienze e Georisorse dell'Università di Padova.**

Il SEM è uno strumento disegnato principalmente per l'acquisizione di immagini ed è quindi adatto allo studio del contrasto morfologico e compositivo, ma comunemente viene integrato da un dispositivo che consente di eseguire simultaneamente anche analisi microchimiche.

Il SEM è costituito, schematicamente, dalle seguenti componenti:

- il *gun*, la parte superiore, dov'è collocata la sorgente, solitamente costituita da un cristallo o un filamento (di esaboruro di lantanio o di tungsteno) che, attraversata da una corrente e portata ad elevata temperatura, produce elettroni per effetto termoionico. Gli elettroni della sorgente che hanno sufficiente energia termica superano una barriera potenziale alla superficie e vengono accelerati verso il basso da una differenza di potenziale variabile tra i 200 eV e i 30 keV andando così a formare il fascio elettronico che andrà quindi ad interagire con la materia.
- la *colonna*, attraverso cui “viaggiano” gli elettroni generati dalla sorgente soprastante; racchiude una serie di lenti elettromagnetiche e fenditure che fanno convergere gli elettroni a formare un sottile fascio, focalizzandoli verso il campione;
- la *camera*, nella quale viene collocato il campione da esaminare in condizioni di vuoto e in cui le bobine di scansione permettono al fascio di muoversi scansionandone una porzione;
- una serie di *rivelatori*, che acquisiscono i diversi segnali generati dall'interazione fascio-campione e li trasferiscono agli elaboratori;
- vari *monitor* su cui viene ricostruita l'immagine prodotta dal segnale.

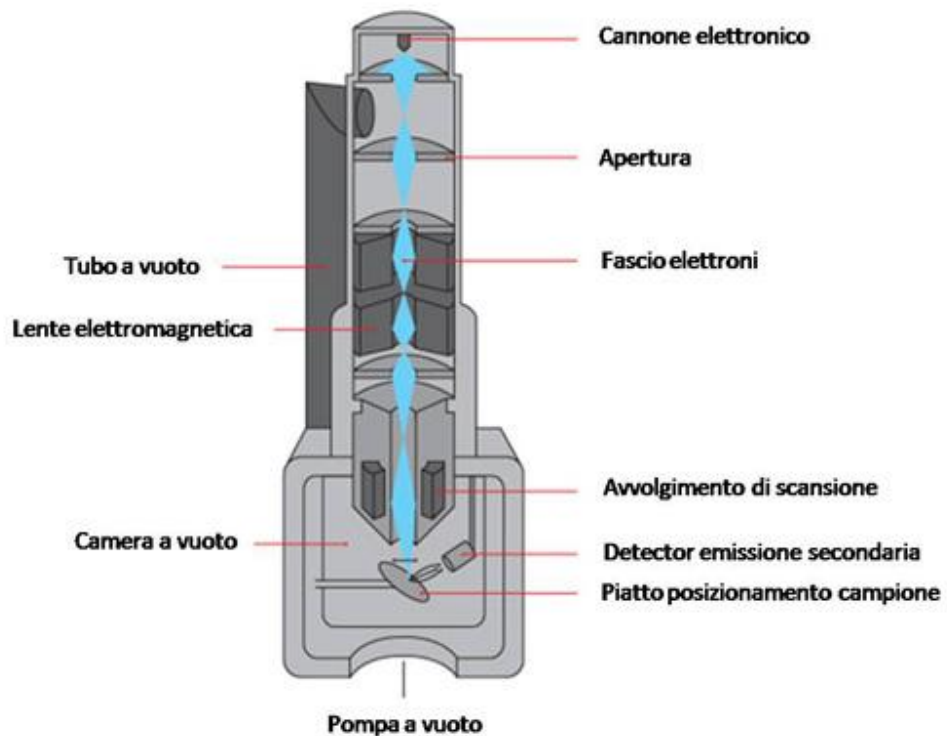


Figura 8: schema interno di un SEM.

Nel momento in cui gli elettroni del fascio colpiscono la superficie del campione questi perdono energia, che viene riemessa sotto diverse forme (Figura 10); ogni tipo di emissione è potenzialmente un segnale da cui si possono ricavare numerose informazioni. Dall'elaborazione di questi segnali si possono quindi estrapolare nozioni di tipo morfologico, ma anche tessiturale e composizionale.

Il SEM utilizzato si trova presso il Dipartimento di Geoscienze dell'Università di Padova ed è dotato di tre rivelatori per acquisire tre diversi tipi di segnale:

- *elettroni secondari* (Secondary Electrons, SE): appartengono al campione stesso e vengono emessi dalla sua parte più superficiale (primi nanometri) successivamente al bombardamento elettronico. Il numero di elettroni espulsi prodotti per elettrone incidente è circa 0.1-0.2, per energie molto basse (< 5 keV) e/o per un angolo molto basso tra la superficie del campione ed il fascio elettronico. Tale valore non varia molto con il numero atomico.

La peculiarità di questo segnale è quella di essere fortemente suscettibile alla morfologia del campione, quindi l'immagine in tonalità di grigi che si ottiene mette in risalto l'aspetto tridimensionale dell'oggetto (Figura 9). L'utilizzo di questa tipologia di segnale è



Figura 9: esempio di immagine SEM ottenuta in SE di pollini a 1000 ingrandimenti (fonte: remf.dartmouth.edu).

rivolto esclusivamente allo studio delle caratteristiche morfologiche di corpi tridimensionali, le cui immagini possiedono una risoluzione spaziale che può raggiungere i 10 nm e un'ampia profondità di campo.

- *elettroni retrodiffusi* (Backscattered Electrons, BSE): al contrario dei precedenti, sono elettroni appartenenti al fascio incidente, che penetrano nel campione e riemergono dallo stesso dopo una o più collisioni. Essi provengono da una profondità di qualche micron e sono enormemente più energetici degli elettroni secondari (in alcuni casi possono raggiungere l'energia del fascio incidente). La loro energia è direttamente proporzionale all'energia del fascio elettronico incidente e dipende dal peso atomico medio del materiale che costituisce il campione. La frazione di elettroni incidenti che riemergono dal campione è infatti fortemente dipendente dal numero atomico medio, in quanto gli elettroni vengono deflessi nel loro percorso all'interno del campione in base al suo numero atomico medio e tale deflessione è maggiore per composti con numero atomico medio superiore. Di conseguenza, le porzioni costituite da un materiale di peso atomico medio più elevato appaiono più chiare rispetto alle parti a peso atomico medio inferiore.

- Radiazione X: raggi X di fluorescenza vengono prodotti dal campione quando viene investito dal fascio elettronico. Interrompendo il moto di scansione e posizionando il fascio in modalità stazionaria sul campione è possibile raccogliere i raggi X prodotti dal micro-volume di campione dove avviene

l'interazione tra gli elettroni del fascio e gli atomi che costituiscono il campione stesso in quel preciso punto. Raccogliendo questo segnale per mezzo di un apposito rivelatore, solitamente uno spettrometro EDS (Energy Dispersive Spectroscopy), è possibile risalire alla

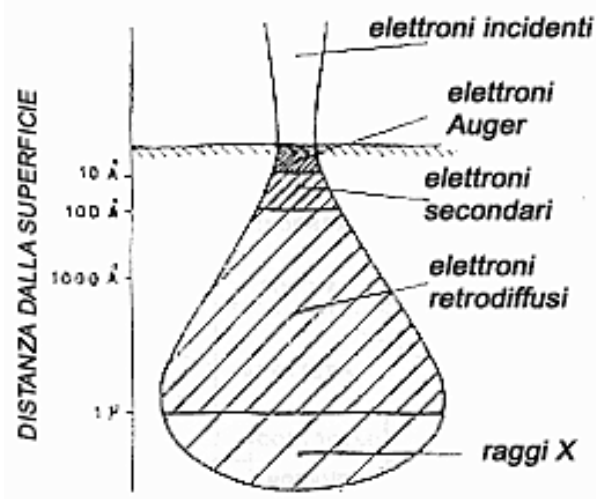


Figura 10: diverse profondità nel campione da cui derivano le varie tipologie di radiazione acquisite dal SEM.

composizione chimica del materiale in esame in ogni suo punto. Ciò che si ottiene è infatti uno spettro di raggi X costituito da una serie di picchi posizionati, nell'ascissa del diagramma, secondo le energie corrispondenti alle specie atomiche che li hanno generati, e la cui intensità (in ordinata) è proporzionale alla quantità dell'elemento stesso.

Per essere osservati mediante un SEM che lavora in condizioni di vuoto, come quello utilizzato per questa Tesi, i campioni necessitano di una determinata preparazione; i materiali poco conduttivi non sono facilmente analizzabili, quindi prima di procedere con l'analisi è necessario renderli parzialmente conduttivi in modo da consentire agli elettroni in eccesso di disperdersi a terra fluendo sulla superficie. Per ottenere questo viene preventivamente depositato sul campione uno spessore di pochi nanometri di un materiale conduttivo (solitamente grafite od oro) nel processo comunemente definito *carbon coating*. Inoltre, a causa del

vuoto non è possibile introdurre nella camera sostanze fluide, perciò i campioni in studio devono trovarsi in condizioni perfettamente anidre.

Durante il presente lavoro di tesi è stato quindi necessario disidratare le gocce di liquido sinoviale centrifugato precedentemente poste sul vetrino, ricoprendo poi il campione con la grafite. Tuttavia, poiché la grafite depositata sulla superficie del campione può renderne difficoltoso lo studio attraverso l'utilizzo di altri strumenti analitici, è stato necessario pianificare le analisi al SEM e il trattamento dei campioni tenendo conto di questa possibile complicazione.

Per quanto riguarda i campioni studiati durante il presente lavoro di tesi l'utilizzo del SEM si è reso indispensabile in quanto ha permesso di osservare ad ingrandimenti elevati (fino a 3000x nel caso specifico) la morfologia dei cristalli e ricavarne una composizione chimica qualitativa. Tali informazioni, combinate con quelle derivanti da altre tecniche, hanno permesso di giungere all'identificazione dei materiali in studio.

Le analisi SEM-EDS eseguite nel presente lavoro di tesi sono state effettuate utilizzando un SEM CamScan MX2500 equipaggiato con un catodo di tungsteno, un detector BSE a quattro quadranti allo stato solido ed un sistema EDAX EDS per microanalisi. Le condizioni analitiche sono state le seguenti:  $\Delta V=20\text{kV}$ , emissione del filamento di circa  $130\ \mu\text{A}$  e una working distance di 27 mm.

### [3.3 Spettroscopia vibrazionale micro-Raman](#)

La spettroscopia Raman, il cui nome deriva dal fisico indiano C. V. Raman, è una tecnica spettroscopica basata sull'analisi di un fenomeno fisico da lui scoperto.

Nella spettroscopia Raman la sorgente utilizzata è un laser (fascio monocromatico di elevata intensità) la cui lunghezza d'onda può essere variata dall'operatore tra il vicino infrarosso e il vicino ultravioletto; questa tipologia di radiazione elettromagnetica, interagendo con il campione, eccita i livelli energetici vibro-rotazionali delle molecole che lo costituiscono. Raman scoprì che una piccola frazione della radiazione diffusa dalle molecole del materiale colpito

dal laser ha energia diversa da quella della radiazione incidente, e che la differenza di energia è legata alla struttura chimica delle molecole responsabili della diffusione: tale fenomeno è stato, quindi, definito “effetto Raman”.

Per le sue caratteristiche questa tecnica di analisi, spesso considerata complementare alla spettroscopia infrarossa (IR), è comunemente applicata nei campi di ricerca delle Scienze della Terra, della Fisica, Chimica e recentemente anche dei Beni Culturali, per condurre analisi chimiche e studi sulla struttura dei composti chimici, con il grande vantaggio di essere una tecnica non distruttiva e “puntuale” (analisi fino alla scala di 0.5  $\mu\text{m}$ ). È importante ricordare che la spettroscopia Raman, a differenza della diffrazione a raggi X, può fornire informazioni a livello locale (*short range*) su varie tipologie di materiali, siano essi cristallini, amorfi, liquidi o gas e le informazioni che si ricavano da tale analisi spettroscopica possono essere sia di natura composizionale (per quanto non sia un’analisi chimica diretta) che strutturale.

La spettroscopia Raman è una spettroscopia di scattering (diffusione) che consiste, come accennato, nel far incidere sul campione una radiazione elettromagnetica monocromatica (laser) di intensità e frequenza nota e raccogliere mediante un rivelatore la radiazione diffusa dal materiale colpito dal laser stesso.

La diffusione generata dall’interazione tra i fotoni del fascio laser e le particelle del campione può essere di due tipi:

- *diffusione Rayleigh*, se la diffusione avviene per interazione elastica, ossia senza alcuna variazione di energia tra i fotoni incidenti e quelli diffusi, e consiste nell’evento più frequente;
- *diffusione Raman* o *effetto Raman*, se la diffusione avviene come conseguenza di un’interazione anelastica, che implica, cioè, un trasferimento di energia dal fotone ad una particella o viceversa. Il fotone diffuso ha energia (generalmente) minore e tale forma di diffusione

avviene per un numero molto limitato di eventi (circa 1 su  $10^6$ ). L'effetto Raman descrive una variazione nella lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica utilizzata che si verifica quando un raggio interagisce con le vibrazioni molecolari ed è l'effetto di diffusione che viene studiato nella spettroscopia vibrazionale Raman.

Di conseguenza, lo spettro Raman di una molecola irraggiata da luce monocromatica racchiude due tipi di segnali:

- la *radiazione Rayleigh*, che risulta essere nettamente la più intensa dello spettro, avente la stessa lunghezza d'onda ed energia della radiazione incidente ( $h\nu_0$ );
- le *linee Stokes*, ossia i segnali corrispondenti alle interazioni anelastiche da cui vengono emessi fotoni ad energia minore di quelli incidenti ( $h\nu_0 - h\nu_1$ ).

Dall'interazione fascio-materia si generano anche le *linee anti-Stokes*, ma solitamente possiedono un'intensità troppo bassa per essere rivelate e, quando misurabili, vengono normalmente analizzate per ottenere informazioni sulle variazioni di temperatura a cui può essere soggetto un campione in esame.

Le informazioni che lo spettro Raman di una molecola può fornire derivano quasi esclusivamente dalle linee Stokes, mentre la radiazione Rayleigh non fornisce alcuna indicazione riguardo la natura del campione, in quanto possiede la stessa energia in ogni analisi in cui viene utilizzato il medesimo fascio laser.

Le linee Stokes, invece, sono legate alle vibrazioni molecolari del campione e vengono perciò studiate principalmente per fini identificativi.

Nella spettroscopia Raman l'aspetto quantitativo è scarsamente considerato, in quanto la disomogeneità della superficie analizzata può inficiare la riproducibilità di una misura. Tuttavia, misure quantitative vengono ad esempio eseguite su inclusioni fluide con lo scopo di determinare le concentrazioni di fasi, per esempio, come la  $\text{CO}_2$ .



L'energia in gioco nell'utilizzo dei laser a più alta frequenza è in grado di attivare nel campione transizioni elettroniche non desiderate, che possono generare fenomeni di fluorescenza e produrre spettri di difficile lettura, in particolare quando si eseguono analisi Raman su molecole organiche. Inoltre, i laser ad alta frequenza possono danneggiare il campione durante l'irraggiamento che può causare un significativo aumento di temperatura. Tuttavia, il fenomeno della fluorescenza può essere minimizzato attraverso una serie di tecniche, come l'utilizzo della configurazione confocale o il photobleaching, oppure adottando un laser avente una lunghezza d'onda maggiore (Yang S. et al., 2013).

Il principio di funzionamento della spettrometria vibrazionale Raman può essere così schematizzato (Figura 11): una radiazione laser viene fatta incidere su di una porzione del campione, la luce diffusa da

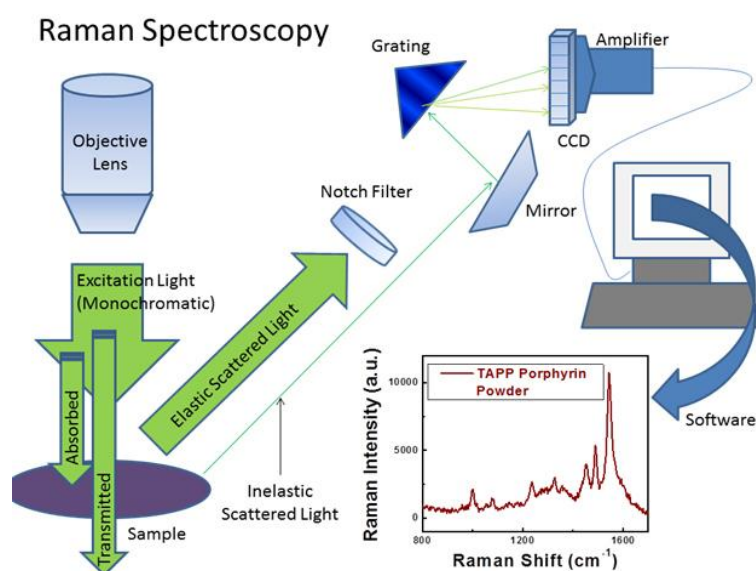


Figura 11: schema di funzionamento della spettroscopia Raman (fonte: nd.edu).

quest'ultimo viene raccolta e quindi analizzata dallo spettrometro.

Il dato ricavato viene visualizzato su di un grafico dove l'ordinata rappresenta l'intensità di emissione luminosa e in ascissa è misurato il "Raman shift" ( $\text{cm}^{-1}$ ), ossia la differenza in numeri d'onda tra la radiazione osservata e la radiazione incidente.

Gli shifts nel Raman corrispondono a frequenze di vibrazione nel campione, in pratica ogni banda in uno spettro Raman rappresenta una determinata vibrazione molecolare. Tali vibrazioni sono controllate dalla dimensione, dalla

valenza e dalla massa atomica delle specie di cui il campione è composto, dalle forze di legame tra gli atomi e dalla simmetria con cui tali atomi sono vincolati. Tutti questi fattori non influenzano soltanto gli shifts delle bande Raman ma anche il numero di bande che possono essere osservate, la loro intensità e le loro ampiezze. Appare quindi evidente come la spettroscopia Raman sia utile per la caratterizzazione strutturale su scala locale dei materiali (anche non cristallini), oltre che per determinare la natura chimica dell'oggetto studiato.

Uno degli ostacoli più difficili da superare nella tecnica Raman (e anche per l'IR) risulta quello di assegnare alle bande osservate specifiche vibrazioni molecolari.

In particolare, tutte le vibrazioni (quindi il movimento collettivo degli atomi presenti in un campione) sono combinazioni estremamente complicate delle cosiddette "vibrazioni normali" o "modi normali" delle rispettive molecole e/o

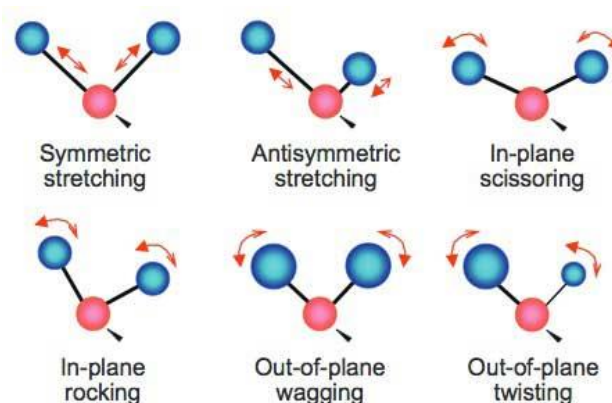


Figura 12: esempi di modi vibrazionali delle molecole.

atomi. Il "modo normale" è un moto composto dagli spostamenti di tutti gli atomi che compongono la molecola. Quando la molecola vibra secondo un particolare "modo normale" tutti gli atomi si spostano in fase e con la stessa frequenza della loro posizione di equilibrio; essi, cioè, si scostano e ritornano sulle loro posizioni di equilibrio contemporaneamente in modo sincrono. Ad ogni "modo normale" corrisponde una definita frequenza.

Tutte le molecole hanno modi di vibrare caratteristici (Figura 12), che possono essere classificati attraverso una precisa nomenclatura che distingue le stretching vibrations, le quali possono dividersi in simmetriche o asimmetriche, e le bending vibrations, che possono mostrare numerose configurazioni (scissoring, rocking, twisting, ecc.).

Al fine di identificare correttamente un materiale, è necessario il confronto degli spettri misurati con altri esistenti in un database o in letteratura.



Figura 13: spettrometro micro-Raman Thermo Scientific DXR (fonte: masterstones.eu).

La strumentazione utilizzata nel presente lavoro di tesi è il Thermo Scientific DXR e consiste di un micro-Raman (Figura 13) ad alto potere confocale, capace di raggiungere uno spot size del raggio laser di circa  $1\ \mu\text{m}$ . Tali dimensioni del fascio permettono di ricavare spettri estremamente precisi e puntuali, anche di oggetti di dimensioni assai ridotte, come alcuni dei cristalli rinvenuti nel liquido sinoviale del presente lavoro, la cui dimensione massima non superava i  $7\text{-}10\ \mu\text{m}$ . Il laser utilizzato è un  $780\ \text{nm}$  con potenza di circa  $5\ \text{mW}$  per evitare di danneggiare i campioni. Lo spettrometro micro-Raman utilizzato è combinato con un microscopio ottico ad alto ingrandimento (fino a  $100\times$ ), dotato di un obiettivo  $50\times$  a lunga distanza focale che permette una risoluzione spaziale di circa  $1\ \mu\text{m}$ , mentre la sua risoluzione spettrale è compresa tra  $2$  e  $4\ \text{cm}^{-1}$ . Tale strumento consente di individuare con la precisione necessaria la porzione di campione da

irradiare. Durante le riprese è stato utilizzato un reticolo caratterizzato da 900 righe/mm e l'esposizione a cui sono stati sottoposti i campioni è stata in media di 10 secondi per almeno due accumuli. Infine, gli spettri Raman sono stati raccolti in un range tra 200 e 3550  $\text{cm}^{-1}$ .

Nel caso specifico del presente lavoro di tesi, l'utilizzo della spettrometria vibrazionale micro-Raman si è rivelato di grande utilità al fine di caratterizzare il particolato presente all'interno del liquido sinoviale patologico delle articolazioni. Nel caso di campioni particolarmente complessi o non meglio caratterizzati, come quelli analizzati nel presente studio, è tuttavia necessario affiancare a tale tecnica altre metodologie analitiche, che possano fornire informazioni complementari come, ad esempio, il chimismo elementare. Unendo gli spettri Raman alle analisi chimiche effettuate mediante la tecnica SEM-EDS, è stato possibile raffinare la ricerca di spettri Raman eventualmente esistenti in bibliografia che corrispondessero a quelli risultanti dall'indagine spettroscopica.

Il vantaggio di poter identificare anche composti amorfi, proprio della spettroscopia Raman, si è rivelato di fondamentale importanza nel contesto di questo studio, in quanto il materiale analizzato, provenendo da articolazioni umane, contiene spesso composti organici, amorfi o cristallini ma con strutture molto disordinate, che non produrrebbero alcun segnale apprezzabile di diffrazione a raggi X e che quindi non potrebbero essere studiati attraverso l'ausilio di quest'ultima tecnica. Un ulteriore fattore favorevole che ha indotto all'utilizzo della spettroscopia Raman consiste nel fatto che il campione non necessita di un iter particolare di preparazione e l'analisi spettroscopica si realizza attraverso un approccio per nulla invasivo. D'altro canto, però, è necessario porre estrema attenzione alla natura del supporto utilizzato in quanto, se il campione presenta uno spessore esiguo, il fascio laser colpisce il supporto stesso, che può a sua volta emettere un segnale Raman, e la misura potrebbe venire compromessa. All'inizio della procedura analitica è quindi

opportuno raccogliere uno spettro del supporto utilizzato, oppure selezionarne uno che presenti picchi estremamente netti.

La maggiore difficoltà nell'identificazione dei campioni in studio si è presentata nel momento in cui, una volta ottenuti gli spettri Raman degli oggetti in studio, si è cercato di determinarne la precisa natura attraverso il confronto con altri spettri Raman presenti in bibliografia. Infatti, non essendo presenti in letteratura database realmente completi e di facile accesso (e che permettessero l'identificazione di uno spettro Raman inserendo il valore di Raman shift dei picchi principali), è stato necessario effettuare una ricerca bibliografica basata soprattutto sulle poche informazioni sui composti in analisi, ricavate attraverso l'ausilio della tecnica SEM-EDS.

### 3.4 Diffrazione a raggi X da polveri

I raggi X (RX) possono venire prodotti da sorgenti convenzionali o non convenzionali; alla prima categoria appartengono i tubi a RX e le microsorgenti a RX, mentre i RX generati attraverso la cosiddetta "radiazione di sincrotrone" appartengono ad una sorgente di tipo non convenzionale.

La radiazione X generata da un convenzionale tubo a RX (Figura 14), adottato nella maggior parte dei laboratori, viene prodotta quando un fascio di elettroni, accelerato da un'elevata differenza di potenziale, colpisce un bersaglio metallico (chiamato anodo o anticatodo) e viene rapidamente decelerato a causa delle collisioni multiple con gli atomi del metallo colpito.

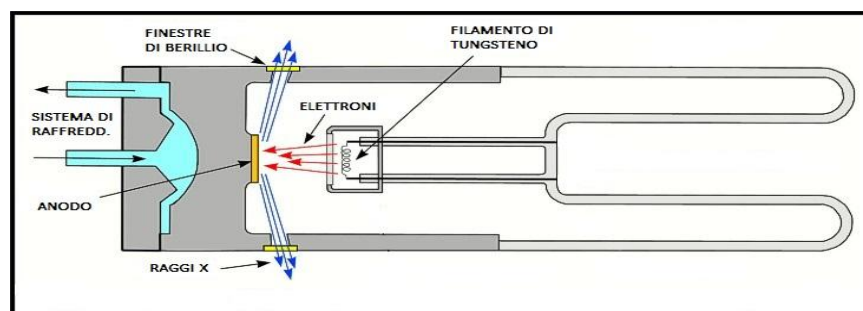


Figura 14: sezione schematica di un tubo a raggi X (fonte: pubs.usgs.gov).

I tubi a RX tradizionali sono costituiti, ad un'estremità, da un filamento di tungsteno (il catodo) attraverso il quale passa una corrente di intensità che può variare tra 20 e 40 mA. Il tubo si trova in condizioni di vuoto, all'interno del quale viene generata una differenza di potenziale ( $\Delta V$ ) con valori di 20-50 kV. Dall'altra estremità del tubo è presente l'anticatodo (o anodo) che verrà colpito dagli elettroni accelerati dalla differenza di potenziale indotta nel tubo producendo la radiazione X, la quale lascerà il corpo del tubo solo attraverso quattro finestre di berillio opportunamente posizionate. Soltanto lo 0.1 % della potenza applicata ad un tubo è trasformata in raggi X, il resto viene dissipata come calore, perciò il sistema di raffreddamento risulta di fondamentale importanza, al fine di ottenere la massima efficienza possibile.

Per quanto concerne la diffrattometria a raggi X delle polveri utilizzata durante il presente studio è stato utilizzato un tubo a raggi X convenzionale con antiscatodo di rame.

Il diffrattometro a raggi X delle polveri è uno strumento utilizzato per lo studio di solidi cristallini attraverso l'applicazione della legge di Bragg<sup>1</sup>. È la tecnica maggiormente utilizzata per l'identificazione e l'analisi quantitativa delle fasi mineralogiche. Nella diffrazione da polveri il campione è costituito da materiale policristallino in polvere, composto da un numero estremamente elevato di cristalliti, con taglia media dell'ordine dei 3-4  $\mu\text{m}$ , distribuiti in modo caotico. La caoticità statistica degli "infiniti" cristalliti permette di misurare le diffrazioni di tutti i possibili piani reticolari simultaneamente. Una volta raccolti i dati di diffrazione si procede inizialmente con l'identificazione della fase o delle fasi presenti nel campione in studio. Una volta identificata la fase (o le fasi) presenti sarà possibile ottenere eventualmente i parametri di cella e, in rari casi, la struttura cristallina (coordinate atomiche e parametri di vibrazione termica); a tal fine si usufruisce di ulteriori metodi, come l'analisi Rietveld.

---

<sup>1</sup> L'Equazione di Bragg ( $2 d_{hkl} \sin\theta = n\lambda$ ) dimostra che date una direzione di raggi X incidenti e una direzione di diffrazione, è sempre possibile individuare una serie di piani reticolari (h k l), paralleli fra loro, tali che i raggi diffratti si comportino come se fossero raggi riflessi.

La diffrazione a raggi X da polveri viene principalmente utilizzata per condurre:

- *Analisi qualitative*: consistono nell'identificazione delle fasi cristalline presenti all'interno del campione. L'insieme dei  $d_{hkl}$  spacings e delle relative intensità nei pattern di diffrazione da polveri sono funzione della composizione chimica del materiale e della sua struttura cristallina. Il riconoscimento delle fasi cristalline avviene grazie a database contenenti più di 400 mila pattern di diffrazione sperimentali di polveri; uno di questi database è l'Inorganic Crystal Structure Database (ICSD) e i file relativi ad ogni fase sono conosciuti con il nome di Powder Diffraction File (PDF). Nel file PDF sono riportate tutte le informazioni necessarie, quali il nome del composto, la referenza bibliografica, i parametri di cella, la radiazione utilizzata, l'elenco delle  $d_{hkl}$  con le relative intensità. Attraverso l'utilizzo del software Highscore Plus (PANalytical) è possibile identificare in modo automatico le fasi in esame attraverso l'ausilio di un database associato contenente circa 244.000 fasi.
- *Analisi quantitative*: risulta possibile determinare l'ammontare delle differenti fasi presenti in una miscela multi-componente.
- *Analisi della struttura cristallina*
- *Indagini sulla microstruttura dei materiali*

Un diffrattometro a raggi X delle polveri è costituito da una serie di elementi, di seguito elencati:

- *Tubo a raggi X*
- *Componenti ottiche*: tra cui monocromatori, slitte (fenditure) e slitte soller.
- *Campione*: costituito da un materiale policristallino ideale dev'essere perfettamente piatto. Se il quantitativo di campione non è abbondante è

possibile riempire un capillare di vetro rotante e studiarlo in geometria a trasmissione.

- *Rivelatori (detector)*: si distinguono in base alla loro dimensionalità e si dividono in puntuali, lineari, areali.

Un diffrattometro a raggi X delle polveri può presentare due diverse geometrie:

- Geometria Debye-Scherrer (in trasmissione): è una geometria che lavora con un fascio di RX parallelo o, al meglio, convergente. Tale geometria risulta più indicata per campioni con basso indice di assorbimento, i quali vengono generalmente posti in un capillare o tra due fogli di Kapton®.
- Geometria Bragg-Brentano (in riflessione parafocalizzante): è la geometria del diffrattometro utilizzato durante il presente lavoro di Tesi.

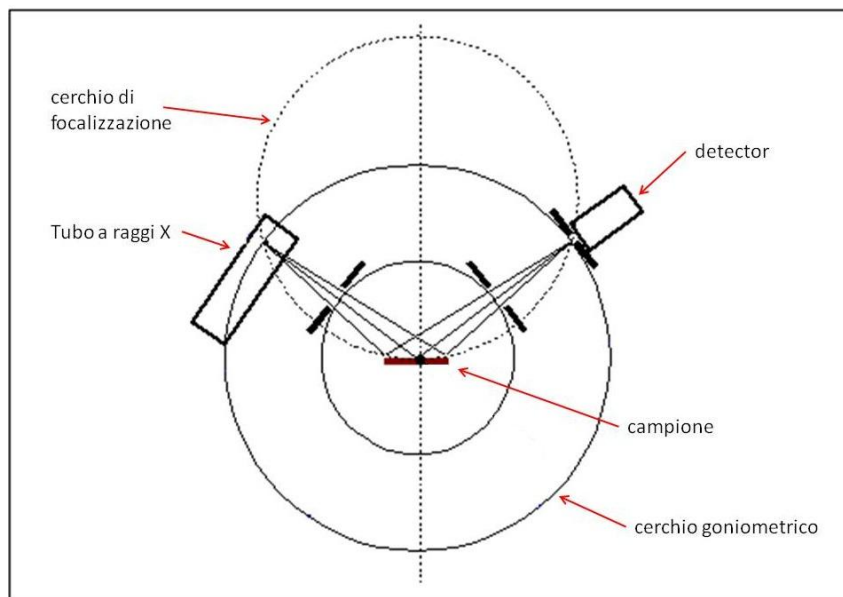


Figura 15: schema della geometria Bragg-Brentano (fonte: servicios.fis.puc.cl).

Tale geometria richiede un campione quanto più piatto, sulla cui superficie il fascio di RX incidente verrà diffratto come se venisse riflesso. La geometria Bragg-Brentano è costituita da due circonferenze immaginarie (Figura 15): la circonferenza goniometrica, su cui si trovano il



tubo a RX e il rivelatore, e il cerchio di focalizzazione. Il campione è posto al centro del cerchio goniometrico lungo la cui circonferenza si muovono la sorgente e il detector con una data velocità angolare  $\theta$ .

Il fascio di RX necessario in questa geometria è divergente, dato che dopo aver inciso sul campione i raggi diffratti convergono verso il rivelatore. I raggi diffratti raggiungono il detector quando il cerchio goniometrico e il cerchio di focalizzazione si intersecano e il detector si trova in questa intersezione. Durante la misura il raggio del cerchio di focalizzazione varia, in quanto cambia il valore angolare  $\theta$ . Se si fosse in presenza di una geometria focalizzante i raggi diffratti verrebbero misurati esattamente in un punto (fuoco), dove si avrebbe convergenza e maggiore intensità del fascio diffratto. Per realizzare una geometria perfettamente focalizzante il campione dovrebbe presentare una curvatura che segue quella del cerchio di focalizzazione, ma, dato che questa cambia durante l'analisi, risulta di impossibile realizzazione: ecco perché la geometria Bragg-Brentano viene definita *para*-focalizzante. Tuttavia si ottengono delle buone intensità diffratte, anche se vengono introdotte aberrazioni, come la posizione angolare dei picchi e l'allargamento asimmetrico dei picchi verso bassi angoli. Quest'ultima geometria descritta risulta essere quella maggiormente utilizzata ed è stata sfruttata anche nel presente lavoro di Tesi.

Dalla diffrazione di una polvere si ottiene una serie di spot di diffrazione che, se il numero di microcristalli è assai elevato (idealmente infinito), si dispongono a formare degli anelli, che rappresentano i coni di apertura  $4\theta$  intercettati dal detector. Tali anelli sono denominati "anelli di Debye" e costituiscono la somma della diffrazione di un numero infinito di cristalliti orientati caoticamente. Integrando in direzione radiale agli anelli si ottiene il diffrattogramma delle polveri, o pattern di diffrazione, costituito da una serie di picchi di intensità che risultano dalla convoluzione del contributo strumentale e del campione. Esso si

presenta graficamente su di un piano cartesiano dove in ascissa si trovano i valori angolari  $2\theta$  e in ordinata le intensità. In un diffrattogramma da polveri vengono valutate: la posizione, l'intensità e l'intensità integrata dei picchi.

Nel caso specifico del presente lavoro di tesi è stato sottoposto a XRPD un solo campione, al fine di condurre un'analisi di tipo qualitativo. Data la quantità assai esigua di materiale cristallino all'interno del campione liquido si è in primo luogo tentata l'analisi attraverso il riempimento di un capillare di vetro del diametro interno di 700  $\mu\text{m}$ , immergendo quest'ultimo in una provetta contenente il liquido precedentemente diluito e centrifugato e prelevandone una goccia dalla porzione concentrata sul fondo della provetta stessa. Il capillare è stato successivamente lasciato disidratare in forno per alcune ore ad una temperatura di 40 °C. Infine, il capillare è stato posto all'interno del diffrattometro in geometria a trasmissione e fatto ruotare a velocità costante per l'analisi. La ripresa eseguita secondo questa modalità, durata circa 20 minuti, però, non ha portato a risultati soddisfacenti in quanto il segnale del vetro amorfo del capillare è risultato estremamente predominante rispetto alla diffrazione prodotta dalla piccolissima porzione di materiale cristallino depositata all'interno del capillare.

Si è perciò tentato di preparare diversamente il campione in modo da ovviare alle difficoltà incontrate con il primo tentativo. Sono state quindi deposte in modo sequenziale più gocce del liquido sinoviale, diluito e centrifugato, su di un supporto (denominato "zero background") costituito da un monocristallo di silicio metallico; la deposizione della goccia successiva avveniva solamente una volta che la precedente era stata completamente disidratata per effetto di sali di silice. Procedendo in questo modo è stato possibile ottenere un piccolo concentrato di cristalli, tale che l'ammontare degli stessi risultasse sufficiente per l'acquisizione di un diffrattogramma. Le misure in diffrazione da polvere convenzionale sono state eseguite utilizzando un diffrattometro PANalytical  $\theta$ - $\theta$ , con una radiazione  $\text{CuK}\alpha$  e condizioni di lavoro a 40 kV e 40 mA, equipaggiato

con un Real Time Multi-STRIP (RTMS) detector (X'Celerator). L'apertura dal detector è  $2.122^\circ$  e questo ha permesso di misurare i segnali di diffrazione in un ampio range angolare e in un tempo molto limitato tra  $4$  e  $100^\circ$  in  $2\theta$ , in modalità continua con uno step integrato di  $0.013^\circ$  in  $2\theta$  per un tempo totale di 84 ore. Il pattern risultante ha presentato, a differenza del precedente, diversi picchi di diffrazione, che sono successivamente stati elaborati e studiati attraverso l'ausilio del software HighScore Plus (PANalytical).

### 3.4.1 Micro-diffrazione a raggi X da polveri

Per confermare i risultati ricavati attraverso la diffrazione a raggi X convenzionale è stata condotta una misura di micro-diffrazione a raggi X su una piccola porzione

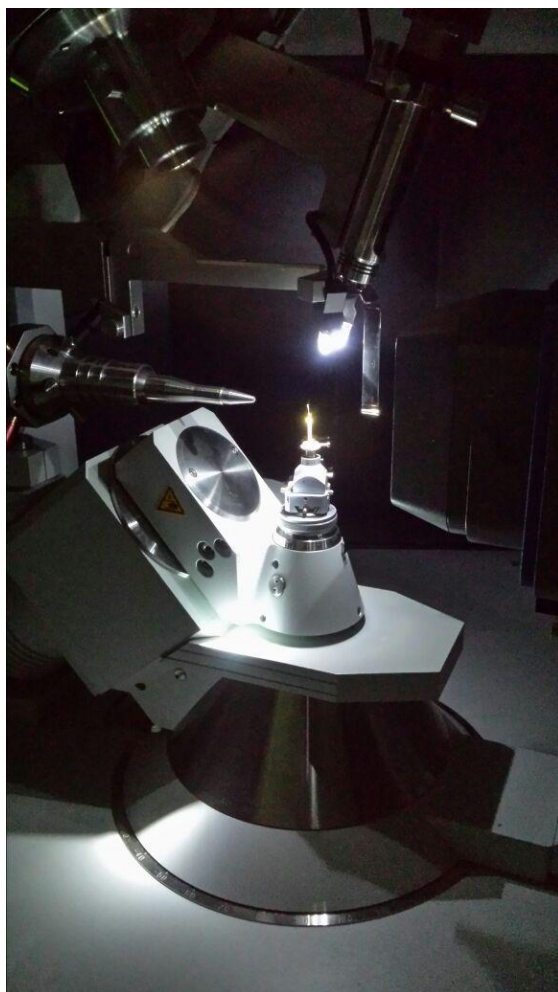


Figura 16: micro-diffrattometro a RX del Dipartimento di Geoscienze dell'Università di Padova.

dello stesso materiale, prelevata per mezzo di un capillare di vetro con diametro di  $100\ \mu\text{m}$ .

Grazie all'acquisizione di una nuova strumentazione scientifica a raggi X (prototipo a livello mondiale) da parte del Dipartimento di Geoscienze dell'Università di Padova (Figura 16) è stato infatti possibile eseguire misure in micro-diffrazione da polvere. La descrizione della tecnica è del tutto analoga a quella trattata per la diffrazione da polveri nel paragrafo 3.4, con la differenza che la micro-diffrazione permette lo studio di campioni di taglia molto minore, fino a circa  $10\ \mu\text{m}$ . Lo strumento

utilizzato per la micro-diffrazione da polveri è un prototipo Rigaku-Oxford Diffraction Supernova equipaggiato con una micro-sorgente a raggi X assemblata con un area detector Pilatus 200K della Dectris. La micro-sorgente, con radiazione MoK $\alpha$ , opera a 50 kV e 0.8 mA. La distanza campione-detector è 68 mm. La sorgente assicura una brillantezza almeno dieci volte superiore ad un tubo a raggi X convenzionale ed è caratterizzata da uno spot di 0.12 mm. Allo stesso tempo, il detector assicura una sensibilità molto elevata ed un trascurabile rumore di fondo. Lo strumento è in grado di studiare campioni di dimensioni estremamente limitate fino a 0.01 mm. I dati di diffrazione da polvere sono stati raccolti in una modalità sperimentale che simula una raccolta convenzionale in diffrazione da polvere. I dati sono stati registrati tra 4 e 20° per un tempo totale di circa 2 ore. Il programma utilizzato per la riduzione dei dati anche in questo caso è stato l'HighScore Plus (PANalytical).

Le misure eseguite in micro-diffrazione sono state effettuate in un range angolare (4-20°) molto inferiore rispetto a quello relativo alle misure eseguite in diffrazione da polvere convenzionale (4-100°). Tuttavia, è da ricordare che la micro-diffrazione è stata eseguita con una lunghezza d'onda  $\lambda=0.7107$  Å contro una  $\lambda=1.5418$  Å utilizzata in diffrattometria convenzionale; questo porta ad una differenza nelle  $d_{hkl}$  misurate meno importante (es.: a parità di range angolare, minore è la lunghezza d'onda utilizzata maggiore è la risoluzione e quindi si misurano  $d_{hkl}$  più bassi).

## 4. Materiali analizzati e trattamento delle campionature

### 4.1 Il liquido sinoviale

Il liquido sinoviale (LS) normale è comunemente considerato un ultrafiltrato del plasma, generalmente privo di alcune delle proteine di elevato peso molecolare, ma contenente diverse macromolecole prodotte localmente, tra cui l'acido ialuronico (AI), responsabile della maggior parte delle caratteristiche chimiche e fisiche del LS.



Figura 17: liquidi sinoviali con caratteristiche macroscopiche diverse (fonte: Punzi L., 2010).

Il LS si presenta viscoso, di colore giallo pallido o incolore (Figura 17), normalmente non coagula; relativamente povero in cellule, viene considerato come un tessuto connettivo dalle caratteristiche peculiari. Tale fluido riempie la cavità articolare che, in condizioni normali, è virtuale e contiene una quantità ridotta di LS (< 4ml). Il LS, a differenza del plasma, è privo di fibrinogeno

(precursore della fibrina) e contiene minime concentrazioni degli altri fattori della coagulazione, ciò spiega perché il LS non coagula.

Il LS è principalmente prodotto dalla membrana sinoviale, tessuto che ricopre tutte le strutture intra-articolari, tranne le superfici della cartilagine articolare e dei menischi (*Punzi L. et al., 2010*). La membrana sinoviale è costituita da circa 1-4 strati di cellule, i sinoviociti, che rivestono una matrice che può essere grassa, fibrosa, articolare, periostale, a seconda della localizzazione di tali cellule all'interno dell'articolazione. Tale membrana è normalmente ben vascolarizzata, contiene vasi linfatici e piccole fibre nervose. Le cellule del rivestimento sinoviale differiscono da quelle delle altre membrane per la mancanza di una membrana basale limitante che le separi dai tessuti sub sinoviali, perciò presentano una superficie discontinua con ampi spazi tra cellule contigue che agevolano gli scambi tra i tessuti.

La produzione e il mantenimento del LS dipendono dalle caratteristiche della membrana sinoviale, che rappresenta una doppia barriera: il flusso di molecole dal plasma deve, in un primo momento, attraversare l'endotelio microvascolare, dopodiché passa attraverso la matrice organizzata che circonda le cellule del rivestimento sinoviale.

Il LS svolge funzioni fisiologiche di filtro-barriera, meccanica, di nutrimento e protezione della cartilagine. Queste peculiarità sono garantite soprattutto dalla presenza di acido ialuronico, al quale sono riconducibili la maggior parte delle caratteristiche reologiche e delle funzioni del LS stesso. Nella cavità articolare l'acido ialuronico, sintetizzato dai sinoviociti, è presente in quantità elevata (circa 3mg/ml), per cui favorisce la compenetrazione delle molecole in modo da ottenere una soluzione altamente visco-elastica. Il ruolo dell'acido ialuronico è sostanziale anche per la funzione meccanica dell'articolazione, che si esplica soprattutto attraverso un'azione ammortizzante e lubrificante; quest'ultima funzione è svolta soprattutto da la *lubricina*, una glicoproteina normalmente presente sulla superficie della cartilagine articolare, secreta dai fibroblasti

sinoviali. Durante il movimento articolare, la capacità lubrificante del LS inizialmente risulta più efficace con l'aumentare della frequenza del movimento stesso; successivamente si riduce, con il potenziamento della sua funzione ammortizzante. Questa funzione sfrutta le caratteristiche strutturali dell'acido ialuronico, la cui molecola si ripiega a formare sferule in grado di comprimersi se sottoposte a carico.

In condizioni patologiche la funzione del LS è alterata. Se prendiamo in considerazione l'artrosi, è noto come nella sua patogenesi svolga un ruolo determinante lo squilibrio metabolico che si crea a livello dei condrociti, le cellule del tessuto cartilagineo, con una sequenza di eventi che coinvolgono tutta la struttura articolare (*Nalbant S. et al., 2003*).

La cartilagine è, infatti, un tessuto connettivale altamente specializzato e le sue proprietà di resistenza al carico dipendono essenzialmente dalla complessa organizzazione della matrice extracellulare basata essenzialmente su tre componenti: acido ialuronico, proteoglicani e fibre di collagene di tipo II. Queste ultime formano una trabecolatura (intreccio) tridimensionale all'interno delle cui maglie sono trattenuti gli aggregati proteoglicanici. Questi complessi macromolecolari sono in grado di richiamare e trattenere elevate quantità di acqua, garantendo al tessuto cartilagineo resistenza al carico anche se sottoposto a considerevoli pressioni.

La disposizione tangenziale alla superficie che assumono le macromolecole di collagene nello strato più superficiale della cartilagine e la lubrificazione del LS garantisce bassi indici di attrito all'interno dell'articolazione. La sintesi e la distruzione di queste complesse macromolecole è regolata dall'unica componente cellulare del tessuto cartilagineo, i condrociti. In condizioni fisiologiche i condrociti sono in grado di garantire un sia pur lento ricambio delle macromolecole danneggiate. Nelle situazioni di stress ossidativo, di ripetuto microtraumatismo, di liberazione di citochine proinfiammatorie, il condrocita, per le sue scarse capacità metaboliche di rigenerare il tessuto cartilagineo,

subisce un processo di apoptosi non programmata. In ultima analisi si instaura un danno tissutale non riparabile, che è alla base del processo artrosico. Vi è, consensualmente un depauperamento del contenuto di lubrificina nel LS con perdita di efficacia della lubrificazione articolare. I microtraumi riducono ulteriormente l'integrità morfologica e funzionale di questo complesso tessuto che dipendono sostanzialmente da un equilibrio tra attività di sintesi e di degradazione, che ha lo scopo di rimuovere le molecole usurate (*Frallonardo P., 2014*).

Le funzioni principali della membrana sinoviale e del LS sono mirate prevalentemente ad agevolare il movimento articolare. L'articolazione è un organo complesso, strutturalmente composta da numerose componenti, anche molto diverse tra loro, provviste di una ricca vascolarizzazione/innervazione ed una complicata rete linfatica, che sostengono sofisticati meccanismi capaci di garantire sensibilità dolorifica, regolazione di pressione e temperatura intra-articolari, sorveglianza immunitaria, reazione infiammatoria.

Infine, il LS svolge una funzione di nutrimento della cartilagine articolare trasportando ossigeno, glucosio e altre sostanze nutritive dai vasi della membrana sinoviale alla cartilagine avascolare.

Solitamente lo studio del LS normale è piuttosto difficile, in quanto la sua quantità è generalmente minima (da 1 a 4 ml), variabile da soggetto a soggetto e a seconda delle dimensioni delle articolazioni. Inoltre, un'artrocentesi "forzata" non riesce solitamente ad aspirare più del 60% della quantità presente, perciò gli studi disponibili sono pochi e talvolta discutibili.



## 4.2 Artrocentesi e pratica clinica

### 4.2.1 Definizione di artrocentesi

L'artrocentesi consiste nel prelievo, mediante ago e siringa sterili monouso, di un campione di LS articolare (Figura 18) e per estensione delle borse e guaine tendinee. È una procedura comune nella diagnosi e terapia di artropatie caratterizzate da versamento (artriti di varia natura, artrosi), viene prevalentemente eseguita dal reumatologo o da altri specialisti che si occupano di patologie articolari (fisiatra, ortopedico).

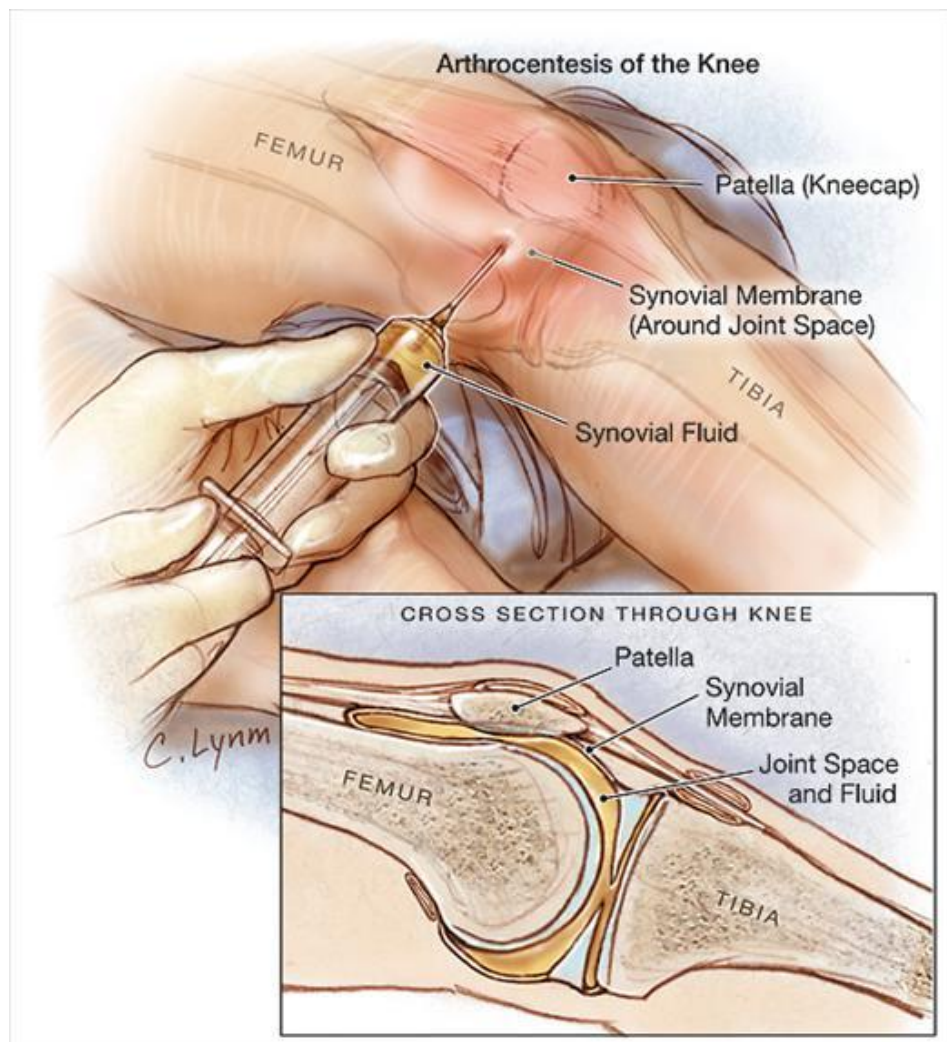


Figura 18: immagine schematica della manovra di artrocentesi. Nel riquadro in basso sezione longitudinale dell'articolazione del ginocchio, rapporti tra i capi articolari e le principali strutture periarticolari (fonte: Zeller J. L., 2007).

#### 4.2.2 Le indicazioni all'artrocentesi

1. L'artrocentesi permette, principalmente con l'aspirazione del LS, di decomprimere l'articolazione, alleviando i sintomi dell'infiammazione e/o drenare il liquido infetto nelle artriti settiche. Attraverso tale procedura è infatti possibile ridurre la pressione intra-articolare e limitare il danno articolare causato da un processo infettivo in atto.

2. La pratica dell'artrocentesi deve essere finalizzata, prevalentemente, alla diagnosi di un processo patologico articolare mediante, in prima battuta, la valutazione delle caratteristiche macroscopiche del campione, quali aspetto, volume, viscosità, colore. L'aspetto macroscopico fornisce informazioni utili relative al grado di cellularità e infiammazione del campione prelevato.

L'analisi del LS, deve essere eseguita a fresco, subito dopo l'artrocentesi, al microscopio ottico a luce polarizzata e compensata, per l'identificazione di microcristalli di urato monosodico, diagnostici per la gotta, o di pirofosfato di calcio (CPP) nell'artropatia da CPP. Inoltre di fondamentale importanza è la conta cellulare totale e differenziale del LS per stabilirne le caratteristiche infiammatorie/non infiammatorie o settiche. Nelle forme infettive, inoltre, l'esame microbiologico e colturale è essenziale per determinare la presenza di microorganismi patogeni. Il LS può essere testato, inoltre, per rivelare la presenza di sangue, proteine e glucosio.

3. L'artrocentesi può avere un'ulteriore valenza terapeutica con il sollievo immediato del dolore e gonfiore mediante la decompressione. Infatti, al fine di ridurre l'infiammazione articolare, può essere iniettato nell'articolazione un farmaco (infiltrazione) in varie forme di artrite come l'artrite reumatoide, le artriti da microcristalli e nelle fasi di *flare* dell'artrosi.

Le sostanze terapeutiche più frequentemente somministrate mediante infiltrazione sono:

- Corticosteroidi a lento rilascio: sono farmaci che agiscono localmente come anti-infiammatori, riducendo i sintomi dell'artrite, controllando l'effetto di alcune citochine proinfiammatorie (interleuchine 1, 6; tumor necrosis factor alfa) nel microambiente articolare. Tali farmaci limitano l'accumulo delle sostanze di degradazione prodotte dalle cellule responsabili del processo infiammatorio all'interno della cavità articolare minimizzando il danno tessutale. L'azione terapeutica dei corticosteroidi a lento rilascio è limitata nel tempo potendo generare sollievo del dolore soltanto per alcuni mesi; in alcuni casi possono risultare inefficaci.
- Acido ialuronico: lubrifica l'articolazione, migliorando le caratteristiche reologiche del LS nella patologia artrosica, consente una più agevole mobilità ed allevia i sintomi come il dolore al carico e gli scrosci articolari. Il beneficio può sussistere per periodi variabili da 6 a 12 mesi.

#### 4.2.3 Procedura dell'artrocentesi

Nella pratica clinica le articolazioni comunemente sottoposte ad artrocentesi comprendono ginocchio, caviglia, spalla, polso e piccole articolazioni di mani e piedi. Nel presente lavoro di tesi sono stati studiati 11 campioni di LS prelevati dall'articolazione del ginocchio e 1 campione dalla porzione dell'avampiede. Durante l'esame obiettivo, un versamento articolare patologico del ginocchio è clinicamente evidenziabile mediante la manovra del "ballottamento rotuleo", in particolare quando vi è una raccolta abbondante di LS. In caso di minime quantità e/o di piccole articolazioni viene utilizzata la *tecnica ultrasonografica* (US) per mettere in evidenza il versamento e, talvolta, effettuare l'artrocentesi ecoguidata (Miksaneck J et al., 2015 e Grassi W et al., 2015). Negli ultimi anni la tecnica US viene impiegata sempre più frequentemente in campo

reumatologico per la sua rapida esecuzione, la non invasività, il basso costo e la ripetibilità. Nello studio dell'artrosi, in particolare della mano, dell'anca e del ginocchio, l'US permette di evidenziare specificamente i cambiamenti a cui va incontro la cartilagine, la conseguente riduzione della rima articolare, gli osteofiti, l'infiammazione e l'eventuale versamento.

Nella pratica dell'artrocentesi, dopo aver individuato correttamente la zona idonea per effettuare il prelievo, di fondamentale importanza è la disinfezione accurata della cute da pungere mediante l'applicazione di una soluzione di iodio liquido, come Betadine® o Braunol® (polivinilpirrolidone complesso iodico) mediante garze sterili. L'artrocentesi viene condotta attraverso l'uso di una siringa sterile monouso munita di ago, anch'esso sterile monouso. Dopo l'aspirazione del LS, il medico può, se necessario, procedere all'infiltrazione intrarticolare.

L'artrocentesi, seguita dall'indagine macroscopica e microscopica del liquido sinoviale, rappresenta una metodica di approccio clinico-diagnostico e terapeutico ormai ampiamente affermata in letteratura, essenziale nella pratica quotidiana del reumatologo clinico secondo le indicazioni della società italiana di reumatologia (*Punzi et al., 2007*).

#### 4.3 Trattamento delle campionature

I campioni di liquido sinoviale forniti dall'Unità di Reumatologia del Dipartimento di Medicina dell'Università di Padova sono stati crioconservati per essere mantenuti nel lungo periodo ed evitare così la loro decomposizione e alterazione.

Dal momento che uno studio multi-metodologico di tale portata riguardante i cristalli presenti all'interno di articolazioni patologiche non è mai stato condotto prima, non si è potuto usufruire di un protocollo procedurale consolidato e la preparazione dei campioni è stata così valutata in base alle tecniche analitiche utilizzate. L'unica procedura che si è svolta secondo le stesse modalità per tutti i campioni esaminati è quella iniziale, che consiste nella diluizione e centrifugazione dei campioni liquidi.

Perciò, dopo aver lasciato scongelare i campioni a temperatura ambiente, questi sono stati centrifugati una prima volta senza alcuna diluizione utilizzando l'Ultracentrifuga EPPENDORF 5414 (Figura 19); dopodiché è stato prelevato loro il sovrantante, aggiunto un mezzo diluente (acqua o etanolo), con lo scopo di separare la frazione organica mediante più leggera ed evitare o limitare la cristallizzazione del cloruro di sodio;



**Figura 19: Ultracentrifuga EPPENDORF 5414 utilizzata per il trattamento delle campionature durante il presente studio.**

i campioni, agitati per alcuni minuti, sono stati posti nuovamente in centrifuga.

Tale procedimento è stato ripetuto per sei cicli complessivi della durata di 10 minuti ciascuno per i campioni GAL, GIB, BUS e PFCD, mentre sono stati sottoposti a quattro cicli di 5 minuti ciascuno i campioni OA59PELLET, P1, BD, 1MN, 2PAM, 3PIZ, 4 CPP e 7.4.15.

Quindi, non esistendo un protocollo standardizzato per il trattamento dei campioni liquidi di tale natura, i primi due campioni, **OA59PELLET** e **P1**, sono stati diluiti utilizzando alcol etilico come solvente, come indicato da fonti di letteratura per il trattamento di campioni contenenti cristalli di urato monosodico e pirofosfato di calcio diidrato (*Rosenthal A. K. et al., 2001*). Prima di procedere con la prima diluizione il campione P1 si presentava come un coagulo bianco-rosato completamente privo di una porzione liquida, il quale è stato disgregato con l'aiuto di un ago precedentemente disinfettato. Il campione OA59PELLET, invece, appariva inizialmente liquido e, dopo aver addizionato etanolo si è notata la formazione di un grande flocculo giallastro, che è stato asportato. In seguito ai successivi quattro cicli di centrifuga della durata di 5 minuti ciascuno dal campione OA59PELLET è stata prelevata la porzione concentrata sul fondo della provetta con un micropipettatore e posta su due vetrini, OA59\_1 e OA59\_2, precedentemente puliti con alcol etilico. Anche dal campione P1 sono stati eseguiti due prelievi della parte concentrata e le gocce sono state distribuite su due vetrini distinti denominati P1a e P1b. I campioni così preparati sono stati lasciati disidratare a temperatura ambiente.

Il campione **BD** è stato suddiviso in due porzioni distinte, che sono state poste in due provette e hanno subito trattamenti differenti: una di queste è stata diluita con alcol etilico (BDETAN), mentre l'altra è stata addizionata con acqua ultrapura Millipore® (BDH2O). Si è subito notata una differenza nel comportamento dei due campioni: l'alcol etilico ha immediatamente indotto a flocculazione il campione, mentre il campione trattato con acqua ultrapura non ha subito

variazioni macroscopiche evidenti. Una volta trattato in ultracentrifuga attraverso il procedimento descritto in precedenza, il campione di liquido è stato posto su due vetrini distinti, le cui gocce sono state in seguito lasciate disidratare in forno a 40 °C.

I campioni **GAL**, **BUS**, **GIB** e **PFCD** hanno subito il medesimo trattamento dei campioni precedenti utilizzando però come solvente soltanto l'acqua ultrapura Millipore®. Posti i campioni in quattro provette uguali e contrassegnate per distinguerle, è stata eseguita una prima centrifuga senza alcuna diluizione, dopodiché è stato tolto il sovrantante e addizionata acqua ultrapura Millipore®. Agitati i campioni manualmente e con l'ausilio di un agitatore per provette sono stati nuovamente posti in centrifuga per il secondo ciclo di 10 minuti. Si è proceduto secondo questa modalità per sei cicli complessivi, in modo da garantire un concentrato di cristalli sul fondo della provetta quanto più libero da residui di materia organica. Ovviamente essendo ogni campione diverso dall'altro alcuni hanno presentato un residuo organico più cospicuo rispetto ad altri.

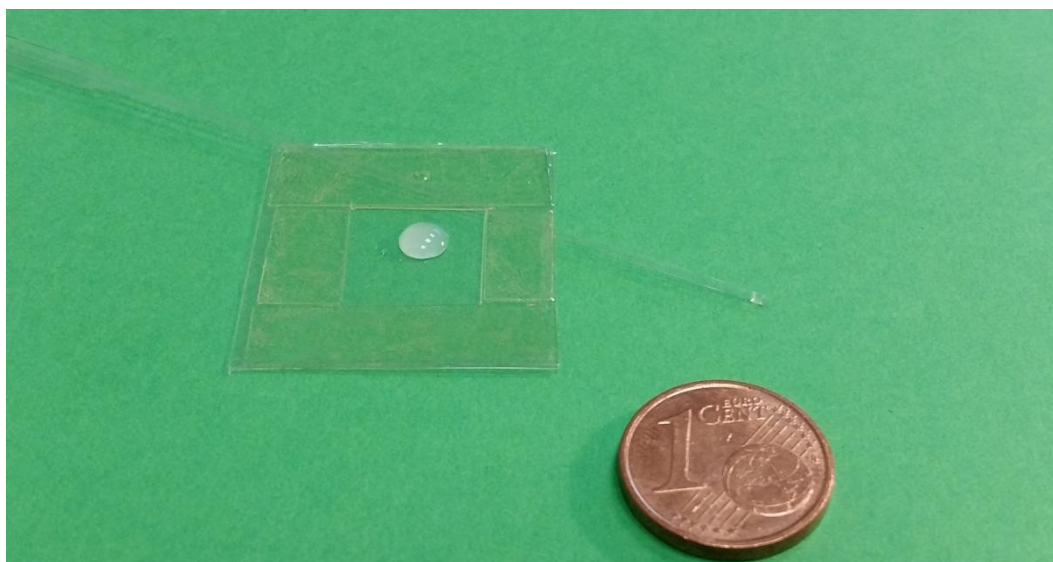
Una volta completati i cicli di centrifuga sono state poste, su vetrini distinti e contrassegnati, una o due gocce per campione prelevate dalla parte inferiore della provetta con l'ausilio di un micropipettatore. Questa operazione è stata eseguita con la massima precisione e cautela in quanto anche solo un piccolo movimento avrebbe fatto sollevare il micro-concentrato facendolo disperdere nel solvente.

I vetrini su cui sono stati depositati i campioni liquidi sono stati successivamente posti in forno a 40 °C fino a completa disidratazione.

Il campione **7.4.15** ha subito lo stesso trattamento dei campioni precedentemente descritti, con l'unica differenza che ha sostenuto quattro cicli di centrifuga da 5 minuti ciascuno. La scelta del supporto su cui depositare il campione liquido è stata a lungo ponderata in quanto si è voluto utilizzare un

materiale che potesse essere idoneo per il maggior numero di tecniche analitiche.

Di conseguenza sono stati testati diversi materiali: plastiche comuni (PET, LDPE, ecc.), tetraborato di litio, araldite, Kapton® e idrato di cellulosa. La maggior parte delle plastiche risulta polarizzata, creando problemi nell'identificazione dei cristalli già al microscopio ottico, il tetraborato di litio, l'araldite e il Kapton® presentano un background in diffrazione troppo marcato, mentre l'idrato di cellulosa è risultato il materiale maggiormente idoneo sia per l'osservazione al microscopio ottico polarizzatore che per le analisi in diffrazione a raggi X. È stato perciò creato un supporto che fosse in grado di sostenere le gocce di campione liquido da far disidratare, ritagliando un piccolo telaio da un foglio di acetato su cui è stato poi fatto aderire un foglio di idrato di cellulosa, in modo che la porzione centrale risultasse occupata soltanto da quest'ultimo materiale. È stato quindi utilizzato un capillare del diametro interno di 700  $\mu\text{m}$  per prelevare alcune gocce di campione liquido dalla porzione concentrata sul fondo della provetta e fatte depositare su tre supporti distinti così realizzati (Figura 20).



**Figura 20: il capillare e telaio di acetato su cui è stato fatto aderire un foglio di idrato di cellulosa; la goccia biancastra sul supporto è il campione di liquido diluito e centrifugato.**



Come ultima operazione è stata prelevata un'altra piccola quantità di liquido concentrato dalla porzione basale della provetta e lasciata all'interno del capillare, che, una volta disidratato, è stato analizzato in geometria a trasmissione in diffrazione a RX delle polveri convenzionale. Il capillare è stato lasciato disidratare in forno per alcune ore ad una temperatura di 40 °C, mentre gli altri tre campioni sono stati lasciati disidratare a temperatura ambiente in un contenitore chiuso in presenza di sali di silice.

Infine, è stato preparato un ulteriore campione, per condurre analisi in geometria Bragg-Brentano al diffrattometro a RX delle polveri convenzionale, la cui preparazione si è svolta come segue: sono state deposte in modo sequenziale più gocce del campione di liquido sinoviale, diluito e centrifugato, su di un supporto costituito da un monocristallo di silicio metallico (denominato "zero background"). La deposizione della goccia successiva avveniva solamente una volta che la precedente era stata completamente disidratata ponendo il campione in un contenitore chiuso in presenza di sali di silice. Procedendo in questo modo è stato possibile ottenere un piccolo concentrato di cristalli, tale che l'ammontare degli stessi risultasse sufficiente per l'acquisizione di un diffrattogramma.

Gli ultimi quattro campioni trattati (**1MN**, **2PAM**, **3PIZ**, **4CPP**) hanno subito una procedura di preparazione leggermente differente: è stata aggiunta una piccola quantità di ialuronidasi, enzima che viene utilizzato per scindere le catene di acido ialuronico in modo da liberare i cristalli senza che questi vengano compromessi (*Cheng X. et al.*, 2009 e *Bolan L. et al.*, 2014). Ogni campione è quindi stato suddiviso in due provette, in una di queste sono state aggiunte due gocce dell'enzima ialuronidasi, il quale è stato lasciato agire per circa 10 minuti, mentre la seconda porzione di campione non è stata modificata. I campioni così preparati sono quindi stati trattati come descritto in precedenza, utilizzando l'acqua ultrapura Millipore® come solvente e sottoponendoli a quattro cicli di centrifuga, ognuno della durata di 5 minuti. Terminati i cicli di centrifuga è stato

prelevato il fondo concentrato di ciascuna provetta e su ogni vetrino distinto per ciascun campione sono state poste due gocce di liquido, una dal campione addizionato con ialuronidasi e l'altra da quello non trattato. I vetrini così preparati sono stati collocati in un contenitore chiuso a temperatura ambiente in presenza di sali di silice fino a completa disidratazione del campione.

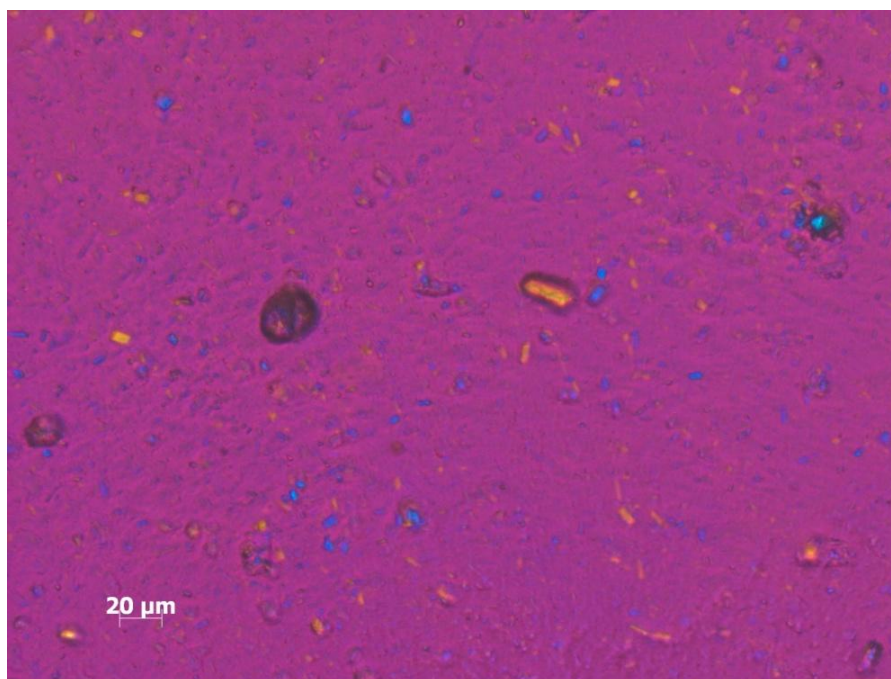
Alcuni campioni trattati hanno mantenuto un accumulo di sostanza organica, la cui consistenza vischiosa ha in alcuni casi impedito allo stesso di staccarsi dalla base della provetta. Questo fattore ha rappresentato una difficoltà non banale, in quanto il coagulo organico tratteneva i cristalli in piccoli ammassi, impedendo loro di disperdersi e poter essere così meglio osservati e analizzati.

## 5. Risultati e discussioni

In questo capitolo vengono illustrati e discussi i risultati ottenuti dallo studio dei campioni di LS presi in esame durante il presente lavoro di tesi. È opportuno precisare che non sempre tutte le metodologie analitiche illustrate nel capitolo 3 sono state utilizzate per l'analisi di ciascuno dei campioni a causa di differenti problematiche che verranno descritte nel presente capitolo.

### 5.1 Campione "7.4.15"

Il campione "7.4.15" è l'unico che è stato studiato attraverso tutte le tecniche analitiche precedentemente descritte.

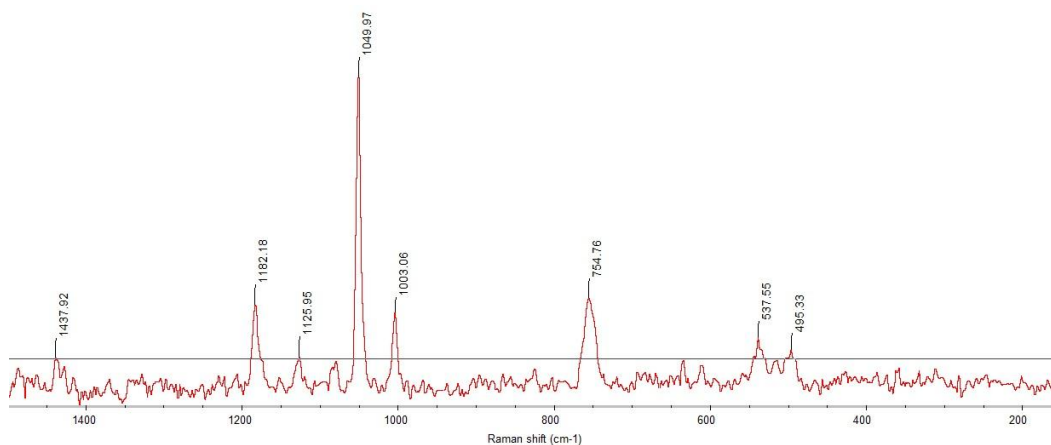


**Figura 21:** cristalli birifrangenti individuati come pirofosfati di calcio (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).

Attraverso la microscopia ottica si è potuto osservare come i cristalli rinvenuti nel campione in studio fossero relativamente abbondanti, ma di dimensioni ridotte, con rari casi di cristalli aventi dimensione massima fino a 20  $\mu\text{m}$ , osservabili in [Figura 21](#).

Con l'ausilio del microscopio ottico in luce polarizzata sono quindi stati individuati i cristalli da sottoporre a successive analisi attraverso ulteriori metodologie analitiche. È tuttavia da precisare che non tutti i corpi che hanno presentato birifrangenza corrispondono ai cristalli oggetto principale di questo studio, infatti molte altre particelle di varia natura possono esibire questa proprietà ottica, motivo per il quale solo le successive analisi specifiche riveleranno ulteriori caratteristiche utili a definirne la vera identità.

Le analisi micro-Raman condotte su alcuni dei cristalli osservati hanno confermato la natura dei corpi birifrangenti precedentemente individuati e selezionati al microscopio ottico polarizzatore, identificati come cristalli di pirofosfato di calcio diidrato. Un esempio degli spettri raccolti è osservabile in [Figura 22](#) e presenta i picchi principali a valori di Raman shift di 1049, 754, 1182, 1125  $\text{cm}^{-1}$ ; tali valori sono perfettamente combacianti con i valori trovati in letteratura ([Figura 23](#)) (*Chen K. et al.*, 2008).



**Figura 22: spettro Raman raccolto da un cristallo che presenta marcata birifrangenza all'interno del campione 7.4.15.**

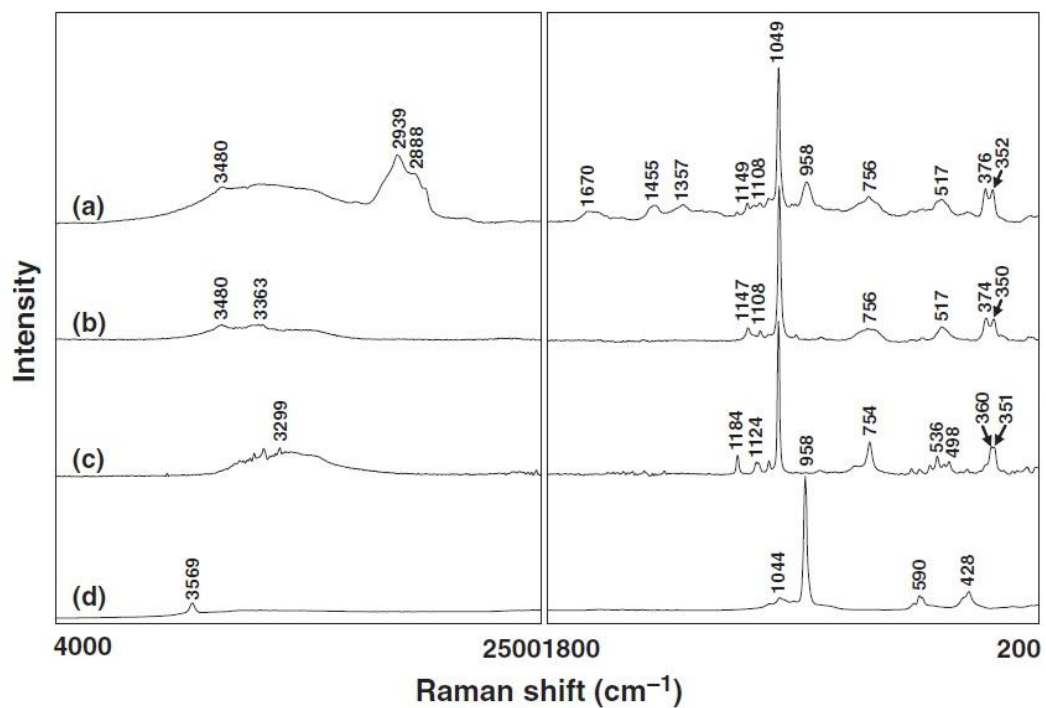


Figura 23: spettri Raman di (a) una placca calcificata, (b) pirofosfato di calcio diidrato monoclino (m-CPPD), (c) CPPD triclinico (t-CPPD), (d) idrossiapatite (HA) (Chen K. et al., 2008).

È possibile constatare dal confronto tra gli spettri di Figura 22 e Figura 23 che i picchi relativi al cristallo analizzato combaciano con la maggior parte dei picchi del pirofosfato di calcio triclinico (c) documentato in letteratura.

Le analisi SEM condotte sul campione hanno evidenziato la presenza di numerosi cristalli, osservabili nella Figura 24, che illustra la stessa porzione del campione in due immagini acquisite simultaneamente da elettroni secondari e da elettroni retrodiffusi.

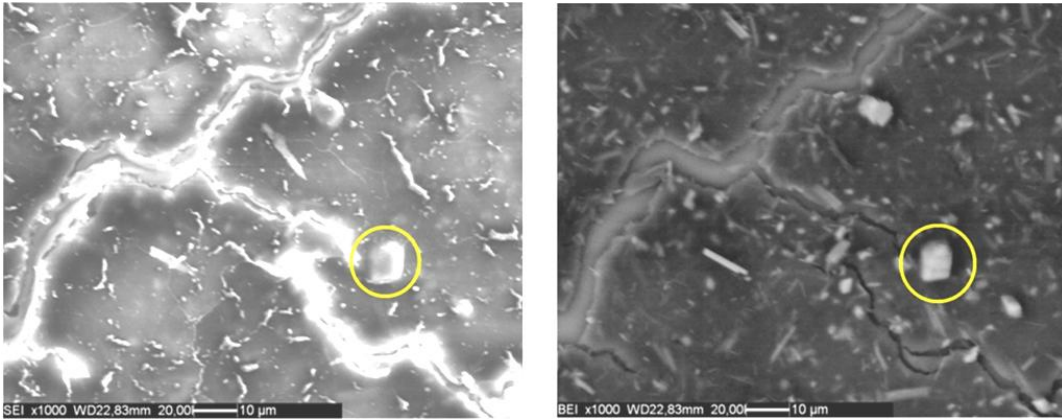


Figura 24: immagine SEM del campione 7.4.15, a sinistra SE e a destra BSE, entrambe a 1000 ingrandimenti. Il cristallo cerchiato è analizzato mediante spettrometria EDS (si veda Figura 25).

È possibile notare che nell'immagine da elettroni retrodiffusi l'identificazione dei cristalli è facilitata in quanto, come descritto nel capitolo 3.2, i cristalli di fosfato di calcio, caratterizzati da un numero atomico medio maggiore, appaiono più chiari rispetto alla base costituita da materiale organico.

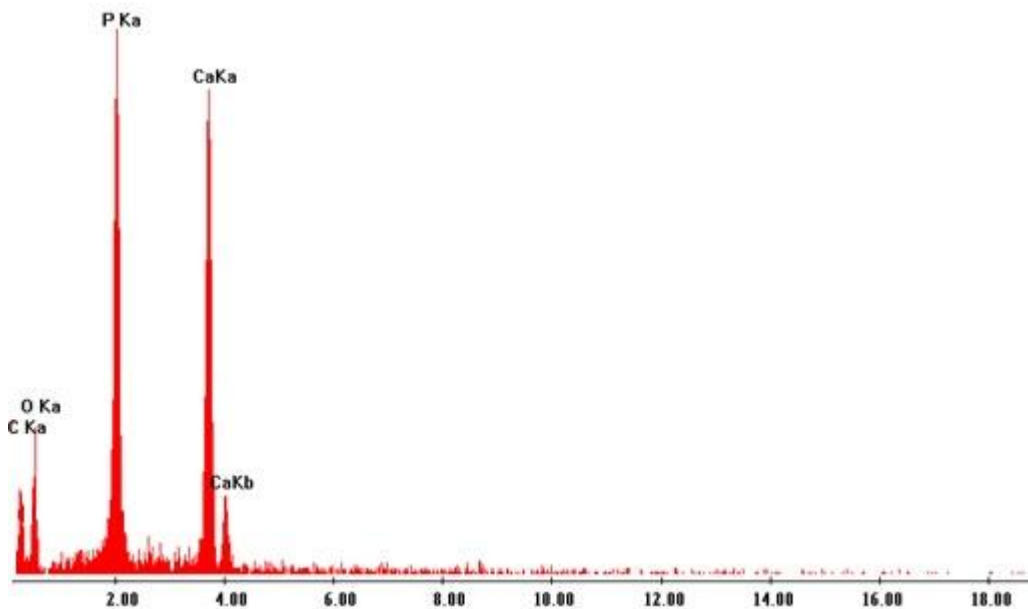
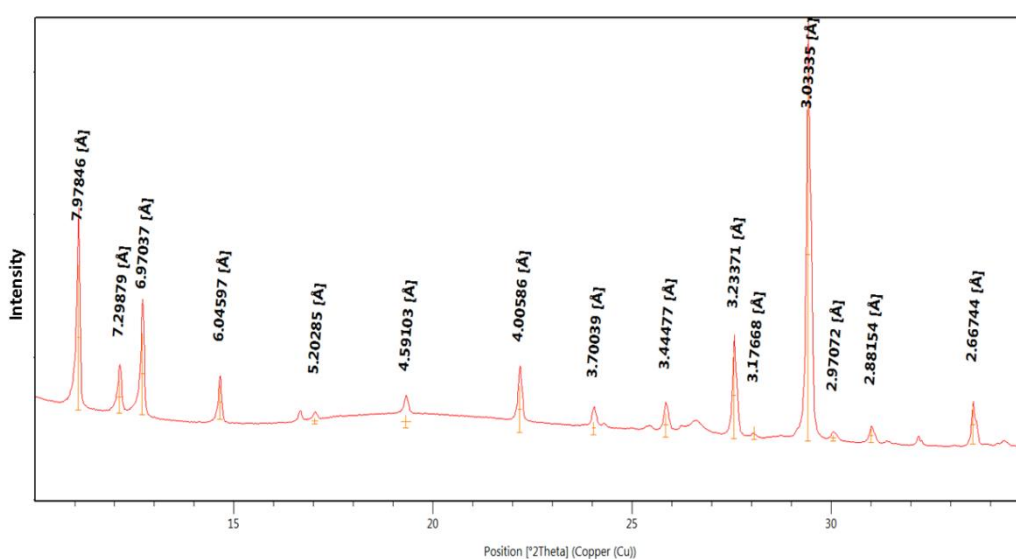


Figura 25: spettro EDS del cristallo cerchiato in Figura 24.

Lo spettro EDS riportato in [Figura 25](#) rappresenta in maniera esemplificativa la composizione chimica del cristallo cerchiato in giallo in [Figura 24](#), che risulta essere costituito da fosforo, calcio e ossigeno. In questo campione sono stati analizzati diversi altri cristalli simili al precedente e tutti hanno rivelato la medesima composizione chimica.

Per quanto riguarda le analisi in diffrazione a raggi X da polveri, a causa della quantità estremamente limitata di campione a disposizione, è stato necessario non solo l'utilizzo del supporto "zero background", ma anche un tempo di misura molto elevato, per un totale di 84 ore.

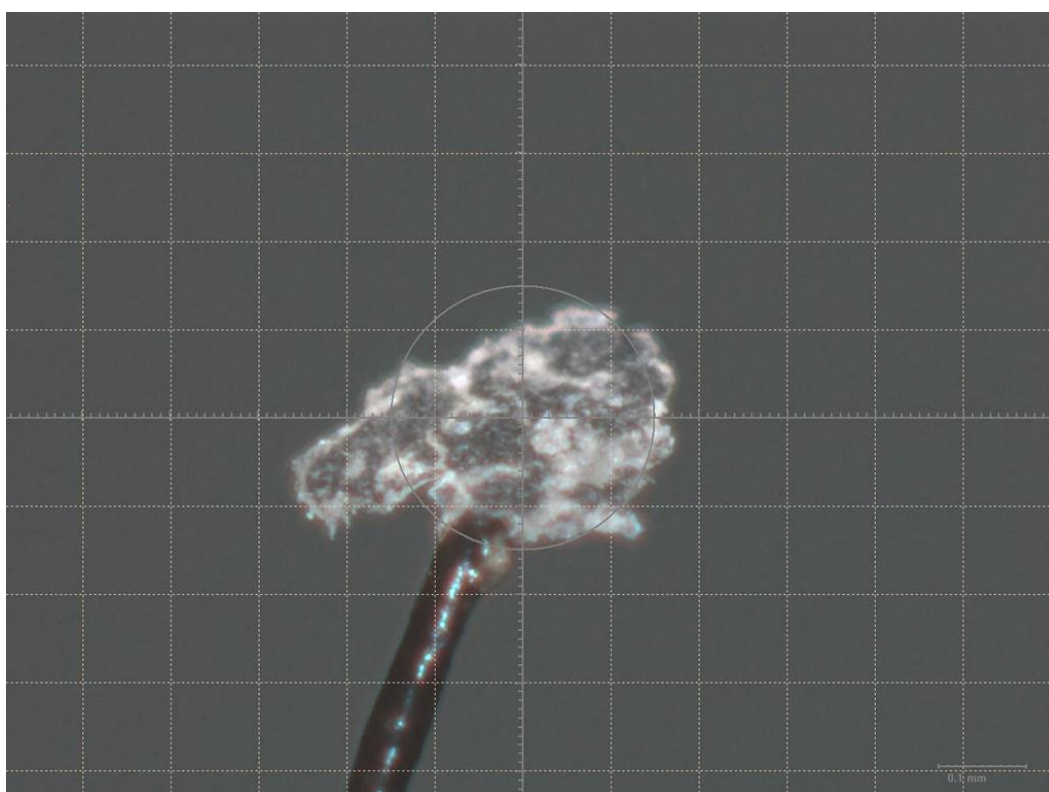
Il pattern risultante, riportato in [Figura 26](#) ha evidenziato diversi picchi di diffrazione, che sono stati trattati e analizzati con l'ausilio del software Highscore Plus (HSP).



**Figura 26: diffattogramma ottenuto attraverso la diffrazione a RX delle polveri convenzionale.**

Numerosi picchi risultano appartenere al pattern di diffrazione del pirofosfato di calcio diidrato, presente nel database PDF con codice di riferimento 041-0488, confermando le precedenti analisi spettroscopiche. Tuttavia, alcuni picchi sono rimasti esclusi da questa identificazione e, malgrado i numerosi tentativi di assegnazione, non si è ancora giunti alla determinazione certa delle ulteriori fasi

presenti nello stesso campione. Il picco di diffrazione molto intenso a circa  $2\theta=29.4^\circ$  potrebbe appartenere alla calcite, ma non sono state ottenute altre evidenze a conferma di tale identificazione. Per comprovare i risultati ricavati attraverso quest'ultima metodologia analitica è stata condotta una misura di micro-diffrazione a raggi X su una piccola porzione dello stesso materiale, prelevata per mezzo di una fibra di vetro con diametro di  $100\ \mu\text{m}$  (Figura 27).



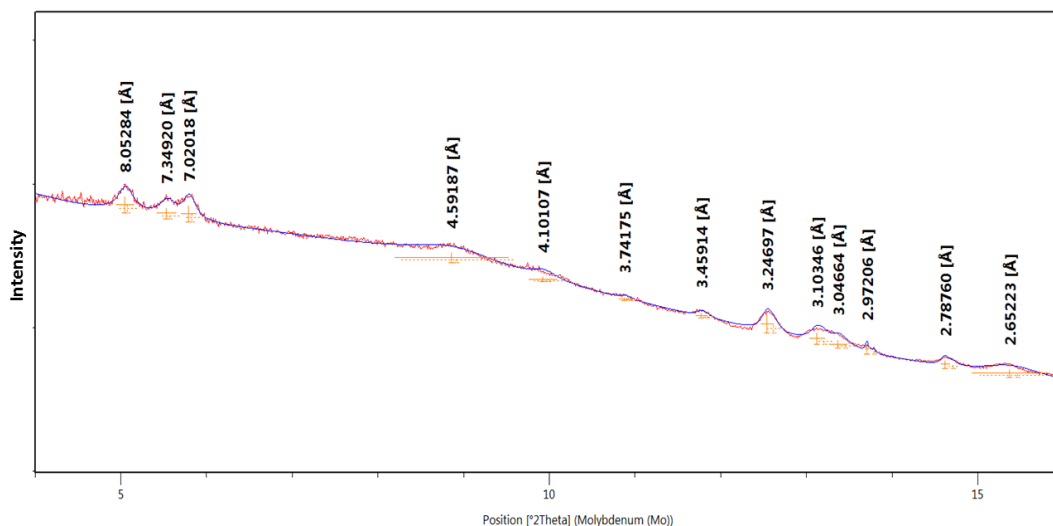
**Figura 27:** porzione del campione 7.4.15 analizzato in micro-diffrazione a RX. Il lato della griglia è  $100\ \mu\text{m}$ , l'area circolare rappresenta approssimativamente l'area irradiata dal fascio di RX.

I risultati ottenuti, osservabili nel diffrattogramma di Figura 28, hanno confermato le analisi condotte attraverso il diffrattometro da polvere convenzionale.

I due diffrattogrammi acquisiti risultano apparentemente diversi in quanto il diffrattometro a RX delle polveri convenzionale utilizzato per ricavare il pattern di diffrazione di Figura 26 impiega la lunghezza d'onda del rame ( $\text{CuK}\alpha=1.5418\text{\AA}$ ), mentre il diffrattometro per la micro-diffrazione a RX sfrutta la lunghezza d'onda



del molibdeno ( $\text{MoK}\alpha=0.7107\text{\AA}$ ). Inoltre i valori delle distanze interplanari sono leggermente differenti nei due diffrattogrammi per motivi strumentali.



**Figura 28:** diffrattogramma ottenuto attraverso la micro-diffrazione a RX di un insieme di cristalli del campione 7.4.15

Attraverso l'analisi delle posizioni dei picchi di diffrazione si è inoltre riusciti a determinare i parametri di cella attraverso l'utilizzo del software UNITCELL di Holland and Redfern (1995). I parametri ottenuti sono:

$$a = 7.3656(9)$$

$$b = 8.2773(21)$$

$$c = 6.6865(8)$$

$$\alpha = 102.87(2)$$

$$\beta = 72.58(2)$$

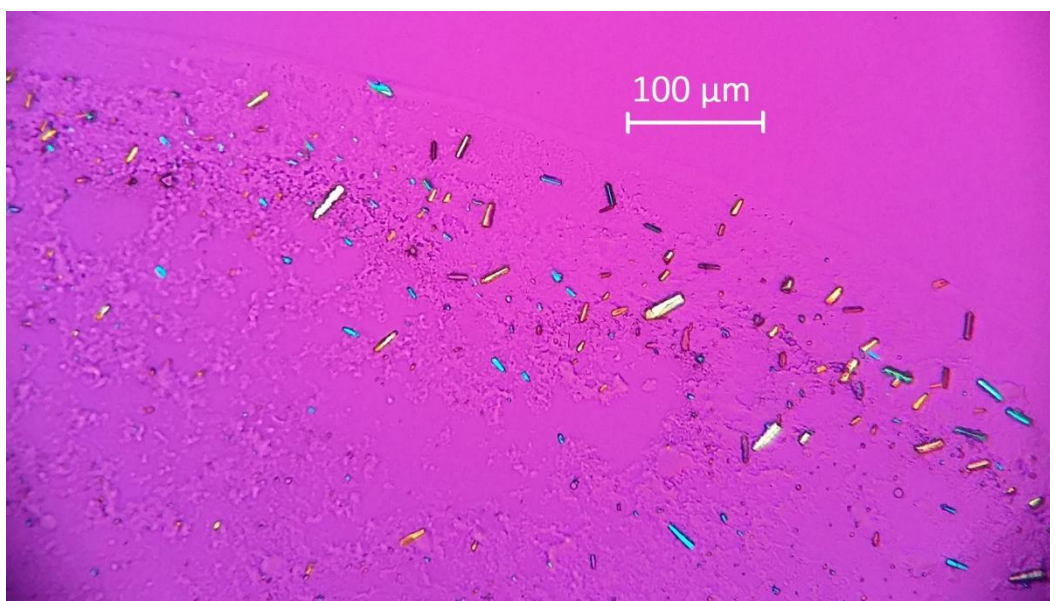
$$\gamma = 95.07(2)$$

$$\text{Vol} = 379.09(9)$$

Tali parametri di cella corrispondono a quelli del pirofosfato di calcio diidrato, come dimostrato in letteratura (Mandel N. S., 1975).

## 5.2 Campione "GAL"

Il campione "GAL", una volta preparato come descritto nel capitolo 4.3, è stato osservato al microscopio ottico in luce polarizzata per l'individuazione di cristalli da studiare successivamente attraverso le altre metodologie analitiche. In particolare, lungo il bordo della goccia disidratata è stata osservata una serie di cristalli prismatici, allungati e birifrangenti, tutte caratteristiche proprie dei pirofosfati di calcio, con dimensioni che raggiungono anche i 25  $\mu\text{m}$  (Figura 29). Un solo dettaglio è apparso incongruente: la birifrangenza anziché essere positiva risultava negativa. Per confermare la presenza di questi cristalli è stata analizzata anche una goccia di LS allo stato liquido, non diluito né centrifugato, confermando la loro presenza anche sul campione precedentemente al trattamento.



**Figura 29: cristalli prismatici birifrangenti del campione "GAL" (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).**

Nella porzione interna della goccia, invece, si sono notate delle conformazioni irregolari non birifrangenti di natura presumibilmente organica (Figura 30),

contenenti particelle birfrangenti di forma molto meno definita e regolare rispetto a quella dei cristalli presenti lungo il bordo della goccia. Tali particelle, di dimensioni variabili tra i 10 e i 70  $\mu\text{m}$ , sono caratterizzate da un abito per lo più tondeggiante e con una birifrangenza con colori variabili e non omogenea sulla particella (Figura 31).

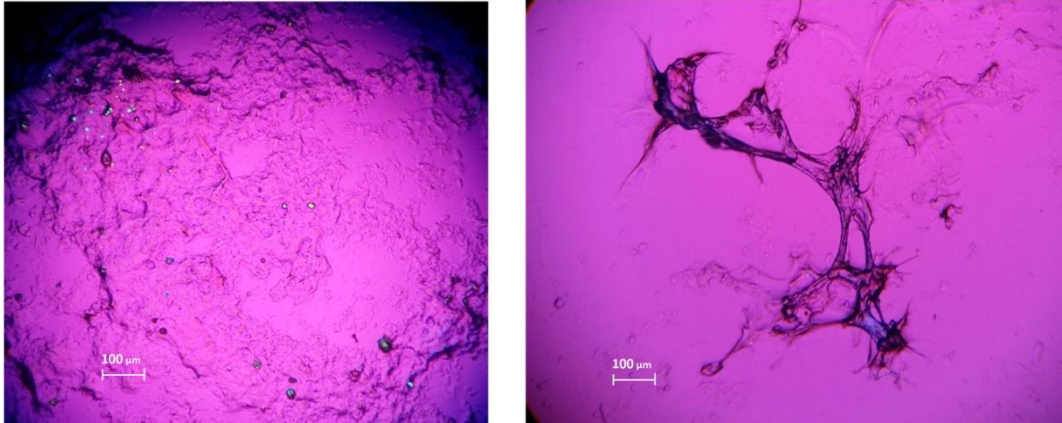


Figura 30: conformazioni “organiche” irregolari contenenti piccoli corpuscoli birfrangenti (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore)

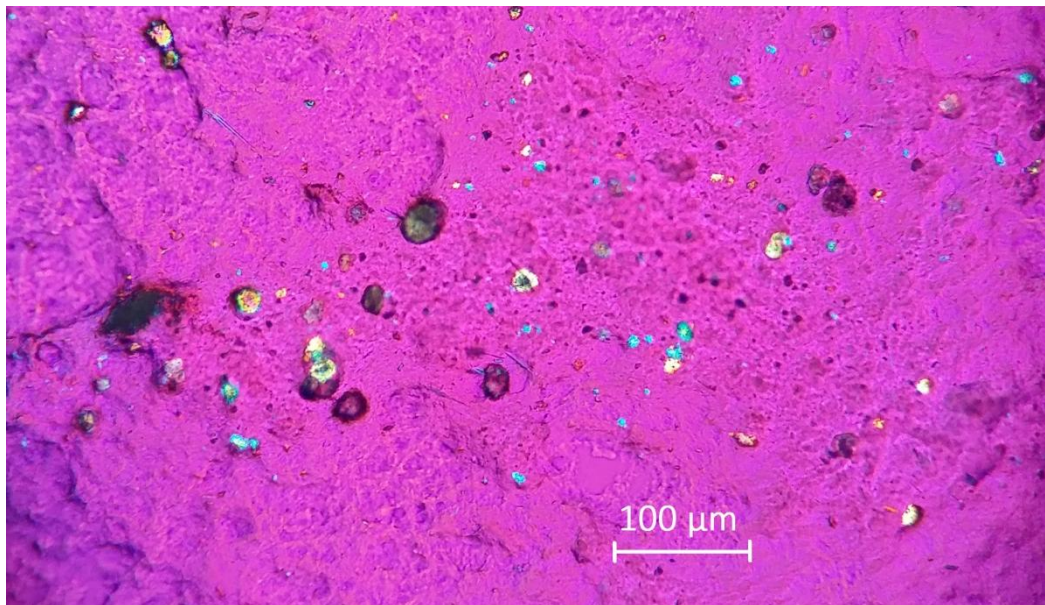
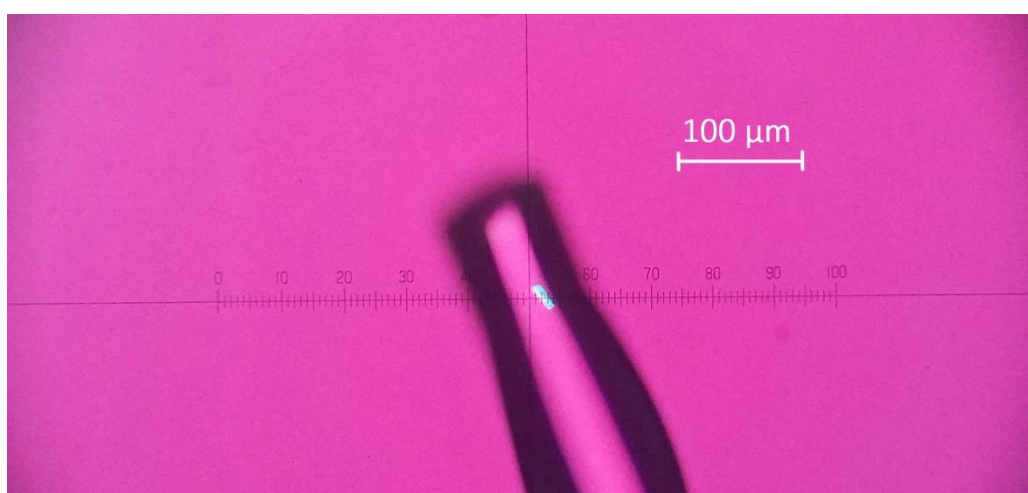


Figura 31: corpi tondeggianti con colori di interferenza variabili (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).

Per procedere con l'analisi in micro-diffrazione a RX uno dei cristalli osservati in [Figura 29](#) è stato quindi montato (pur con difficoltà) su di una fibra di vetro del diametro di 100  $\mu\text{m}$ . La principale complicazione nel prelievo di un singolo individuo si è rivelata essere la durezza estremamente bassa dei cristalli: questi infatti si frammentavano al primo contatto con il capillare utilizzato per raccogliarli dal supporto. Tale comportamento è sembrato anomalo in quanto i fosfati di calcio possiedono una durezza piuttosto elevata. Si è quindi proceduto applicando una goccia di acqua ultrapura Millipore® su una piccola porzione del campione, in modo tale che i cristalli andassero in sospensione e fosse così possibile recuperarli senza rischiare la rottura; la tensione superficiale troppo elevata dell'acqua, però, ha impedito alla fibra di vetro di raggiungere i cristalli stessi. Un nuovo tentativo è stato realizzato utilizzando l'alcol etilico e l'acetone, per la loro minore tensione superficiale, ma purtroppo i piccoli cristalli a contatto con questi fluidi si sono disciolti completamente in pochi secondi. Si è quindi tentato nuovamente questa operazione con l'utilizzo della glicerina, la quale, oltre ad aver portato in sospensione i cristalli, ha svolto anche la funzione di collante per il cristallo sulla fibra di vetro, osservabile in [Figura 32](#).



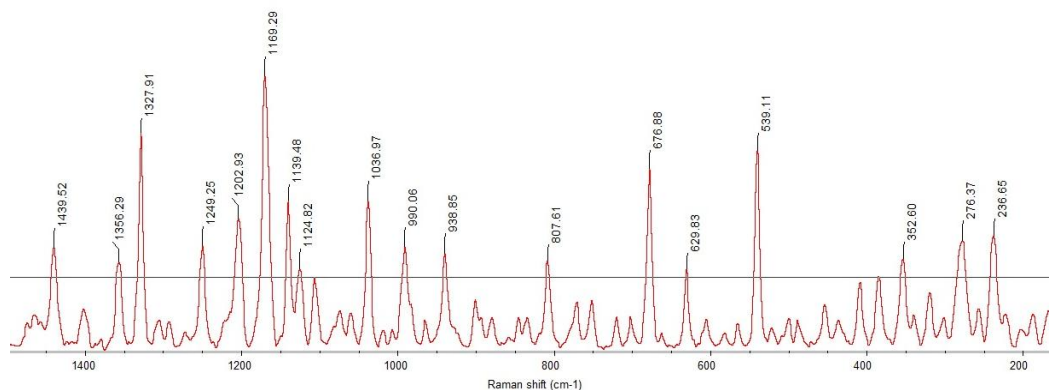
**Figura 32:** cristallo montato sulla fibra di vetro utilizzando la glicerina (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).

Successivamente la fibra con il cristallo è stata montata al diffrattometro da cristallo singolo per micro-diffrazione ed è stata eseguita una misura preliminare dalla quale, però, non è risultato alcuno spot di diffrazione. Questo risultato per certi versi inaspettato ha portato a formulare diverse ipotesi: a) nonostante l'abito e la birifrangenza il materiale analizzato non è cristallino; b) il cristallo ha uno spessore troppo esiguo e per quanto la strumentazione sia estremamente sensibile non è riuscita a rilevare alcun segnale; c) il segnale di diffrazione del cristallo potrebbe essere stato troppo debole, venendo totalmente assorbito dal vetro della fibra; d) la radiazione X ha danneggiato irreversibilmente il cristallo in pochi secondi.

Al fine di spiegare le osservazioni raccolte da microscopia ottica e micro-diffrazione i cristalli sono stati analizzati attraverso la spettroscopia micro-Raman. Le misure hanno fornito spettri caratterizzati da un numero molto elevato di bande. In particolare, i principali picchi sono posizionati a valori di Raman shift di 1169, 1328, 539, 677  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 33). Tali picchi non sono risultati appartenere a nessuno dei composti oggetto di studio del presente lavoro di tesi.

È stata quindi tentata l'interpretazione degli spettri acquisiti allo spettrometro micro-Raman con l'ausilio del software OMNIC, ma la loro complessità ha impedito l'individuazione del composto analizzato in quanto non presente in alcuno dei database consultati.

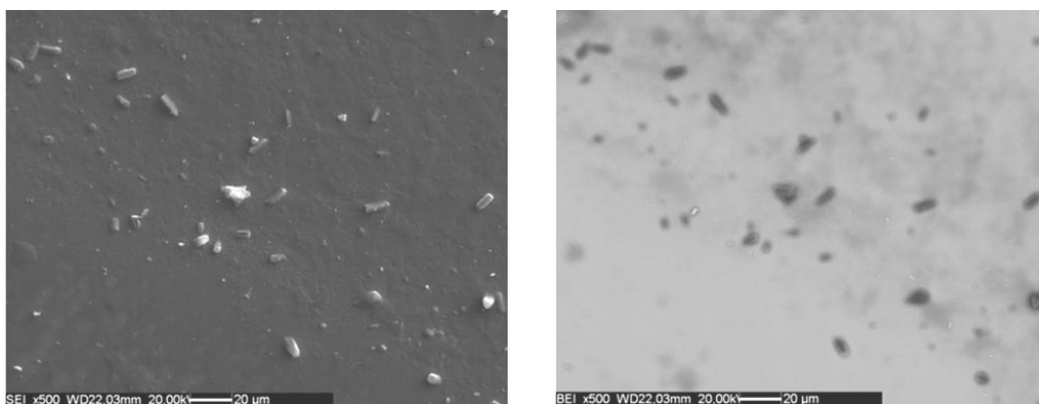
Tuttavia tale analisi ha confermato che i cristalli prismatici e birifrangenti osservati al microscopio ottico polarizzatore in realtà non sono pirofosfati di calcio, come invece erano stati interpretati in un primo momento.



**Figura 33: spettro Raman raccolto da un cristallo prismatico e birfrangente del campione "GAL".**

Per confermare ulteriormente che i cristalli osservati non sono pirofosfati di calcio è stato analizzato lo stesso campione al SEM, attraverso cui si è notata una tonalità scura dei cristalli agli elettroni retrodiffusi (Figura 34). Inoltre, gli stessi sono risultati essere composti prevalentemente da carbonio e ossigeno, come dimostra lo spettro EDS in Figura 35. Nel medesimo spettro i picchi del silicio, del calcio e del sodio sono generati dal vetrino sottostante utilizzato come supporto per depositare il campione.

È stato quindi ipotizzato che tali particelle, osservate in questo campione, possano rappresentare dei composti organici forse derivanti da farmaci utilizzati nel trattamento delle artropatie durante le infiltrazioni in seguito all'artrocentesi. Tuttavia, non è ancora stata accertata la loro vera natura e genesi.



**Figura 34: immagine SEM del campione "GAL", a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 500 ingrandimenti.**

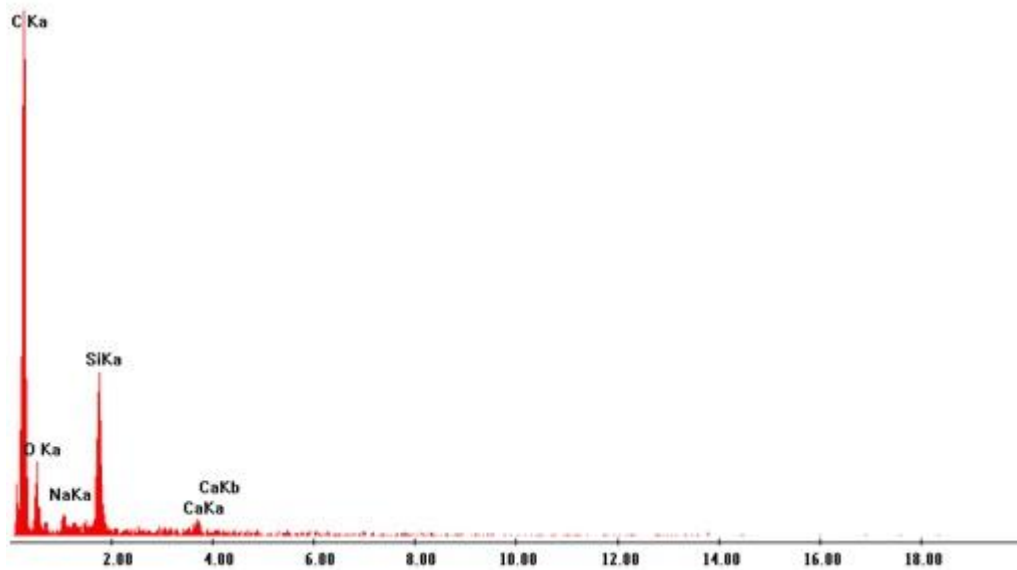


Figura 35: spettro EDS delle particelle che appaiono scure in Figura 34.

I cristalli di pirofosfato di calcio sono stati comunque individuati attraverso successive osservazioni al SEM, in particolare in immagini acquisite da elettroni retrodiffusi (Figura 36). Lo spettro EDS dei pirofosfati di calcio è riportato in Figura 38.

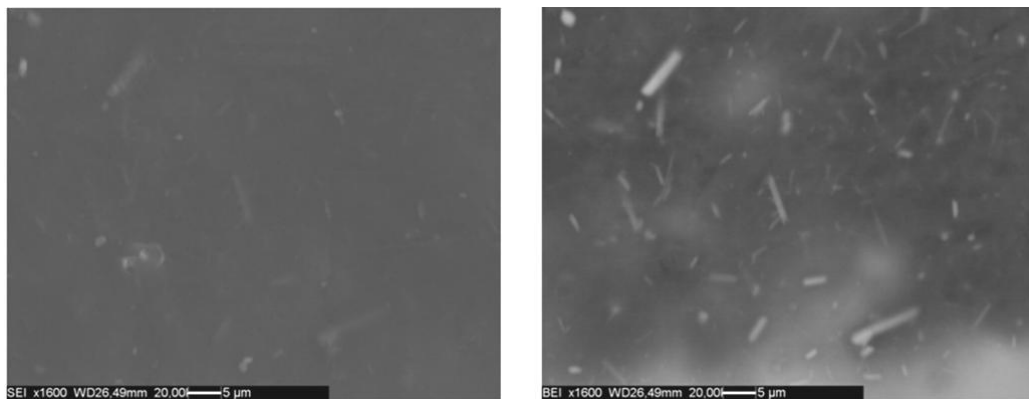


Figura 36: immagine SEM del campione "GAL", a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 1600 ingrandimenti.

Inoltre i cristalli di fosfato di calcio sono stati osservati anche sotto forma di ammassi composti da numerosissimi cristalli, osservabili in Figura 37, i quali non

sono stati riconosciuti come tali durante le osservazioni condotte al microscopio ottico polarizzatore, in quanto erano visibili all'interno di aggregati birifrangenti piuttosto che come singoli cristalli.

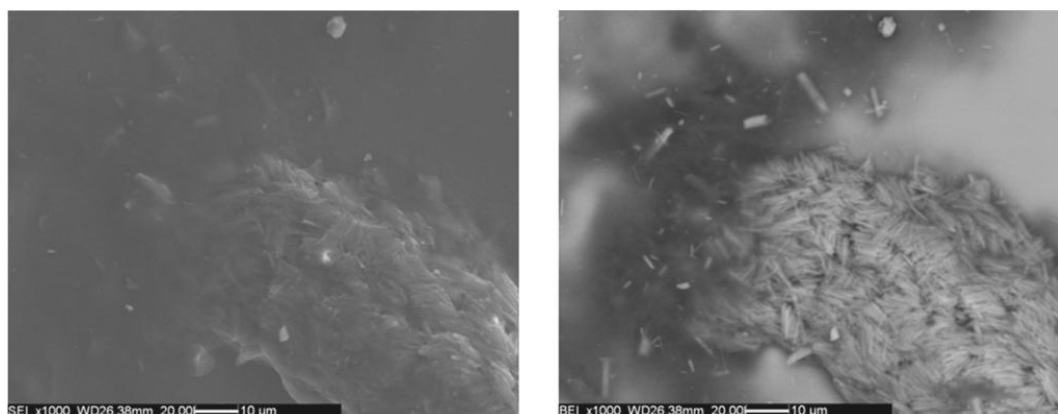


Figura 37: immagine SEM del campione "GAL", a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 1000 ingrandimenti.

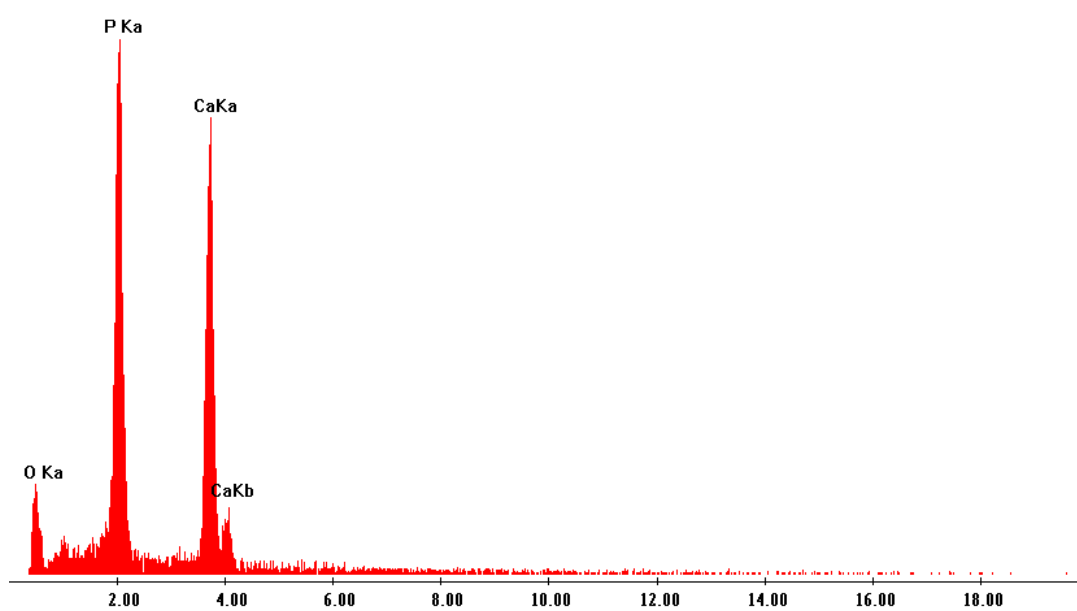


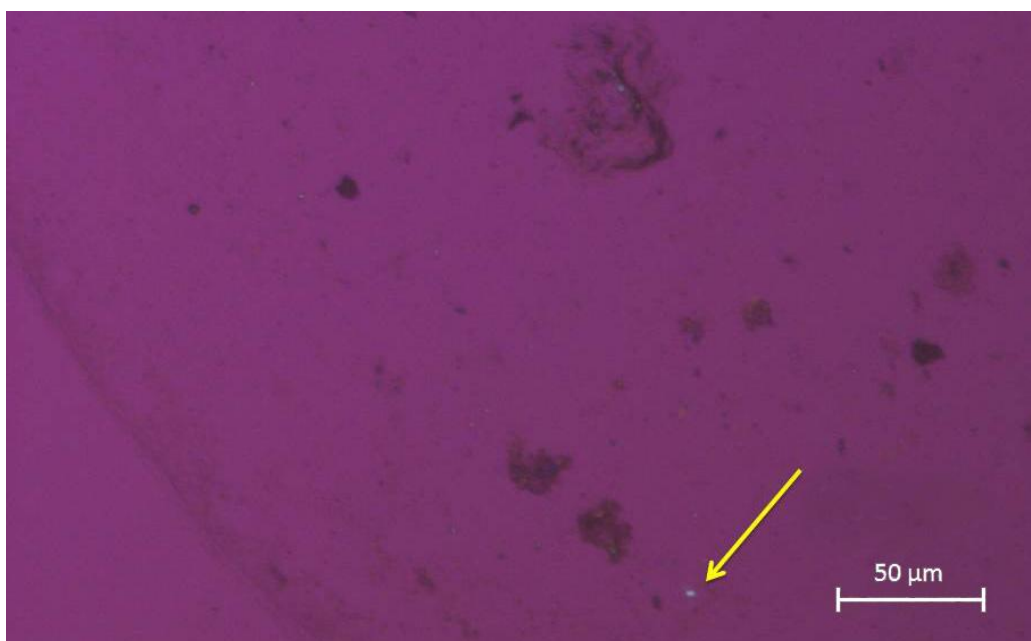
Figura 38: spettro EDS dei cristalli di fosfato di calcio.



La complessità emersa dall'analisi di questo campione lascia intendere quanto uno studio approfondito dei cristalli presenti in LS di articolazioni patologiche non possa svolgersi con l'ausilio di una sola tecnica analitica, ma è necessario l'utilizzo combinato di più metodologie per fornire una caratterizzazione il più possibile completa e corretta.

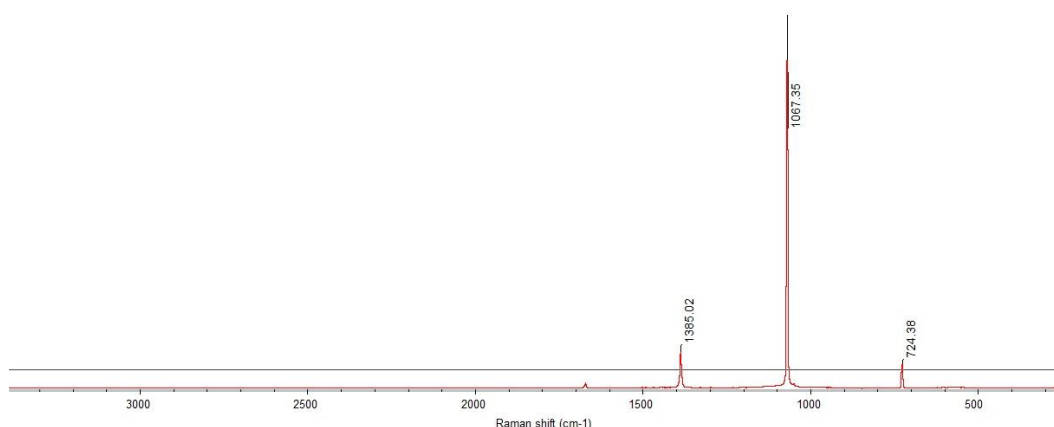
### 5.3 Campione "BUS"

Il campione "BUS", analizzato al microscopio ottico polarizzatore, si è dimostrato assai povero di cristalli prismatici birifrangenti. I rari esemplari osservati hanno presentato dimensioni ridotte, fino ad un massimo di 5  $\mu\text{m}$ ; in [Figura 39](#), indicato dalla freccia, è possibile osservare un esempio di come apparivano i pochi cristalli di questo campione.



**Figura 39: un cristallo birifrangente, indicato dalla freccia, del campione "BUS" (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).**

Al fine di chiarire la natura dei cristalli birifrangenti osservati al microscopio ottico sono state condotte delle analisi attraverso la spettroscopia micro-Raman. Gli spettri acquisiti relativi ai cristalli sono risultati essere caratterizzati da bande molto nette, collocate a valori di Raman shift di 1067, 1385, 724  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 40).



**Figura 40: spettro Raman dei piccoli corpuscoli birifrangenti individuati nel campione BUS.**

Il risultato ottenuto attraverso le analisi condotte con la spettroscopia micro-Raman si è dimostrato inaspettato e ambiguo. È stato quindi necessario utilizzare il SEM-EDS al fine di ottenere informazioni chimiche in modo tale da rendere la ricerca degli spettri più specifica e comprendere al meglio la natura di questi cristalli.

Da immagini SEM si sono potuti notare diversi cristalli dalle forme prismatiche e tozze (Figura 41), ma ai BSE sono apparsi scuri e non “luminosi” come ci si sarebbe aspettato dai fosfati di calcio. In Figura 42 è possibile osservare un cristallo estremamente piccolo dall’abito prismatico perfettamente idiomorfo.

Inoltre, l’analisi EDS sui cristalli osservati ha rivelato che essi sono costituiti principalmente da sodio e ossigeno (Figura 43).

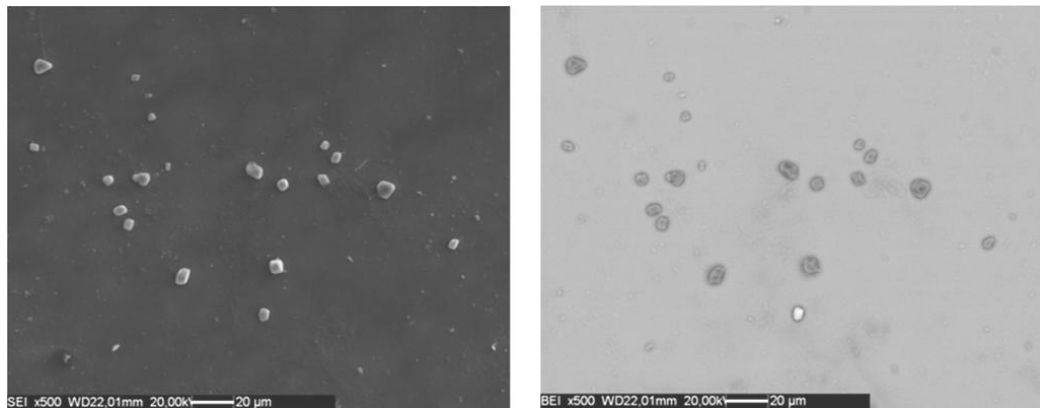


Figura 41: immagine SEM del campione "BUS", a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 500 ingrandimenti.

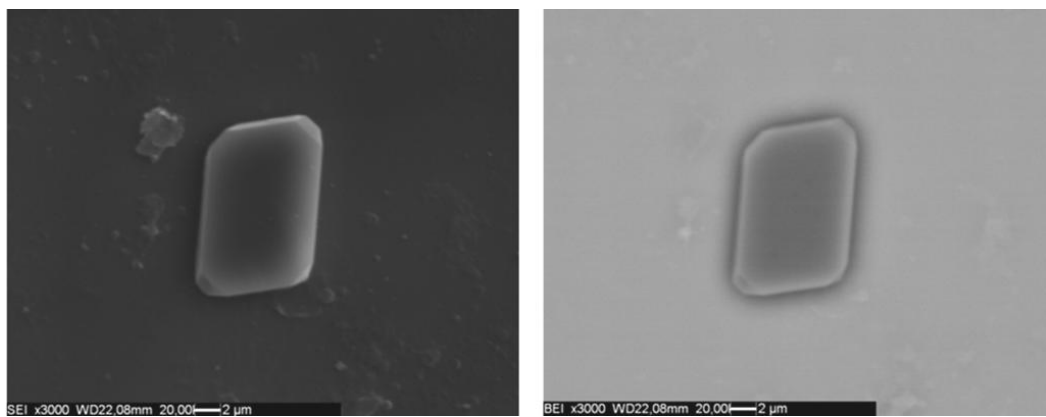


Figura 42: immagine SEM del campione "BUS", a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 3000 ingrandimenti.

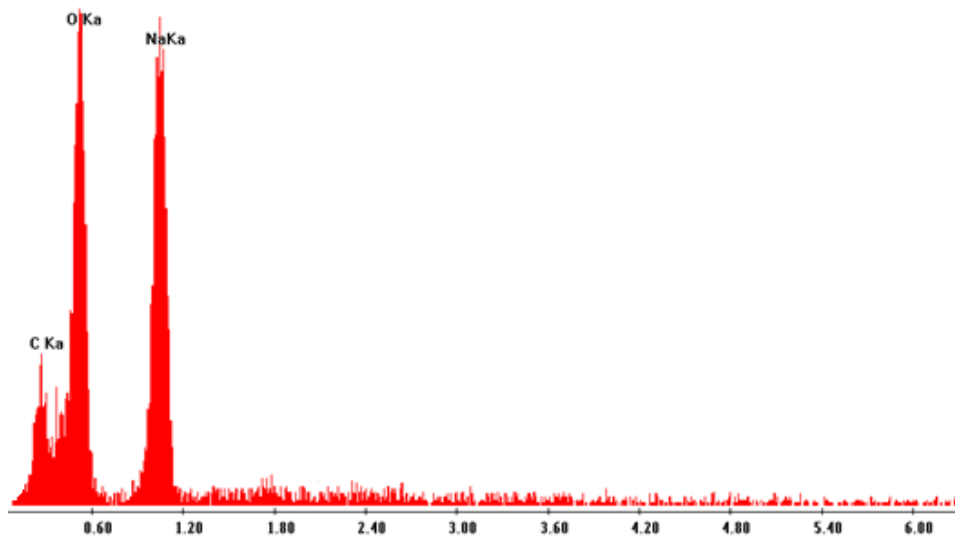


Figura 43: spettro EDS dei cristalli di Figura 41.

Una volta ottenuto il chimismo dei cristalli è stato più semplice interpretare gli spettri Raman precedentemente acquisiti programmando la ricerca in base alle informazioni chimiche ottenute dagli spettri EDS.

Grazie al confronto degli spettri Raman acquisiti sperimentalmente con altri spettri presenti in letteratura (Figura 44) (Rousseau D. L. et al., 1968 e Nakamoto K. et al., 2008) si è concluso che i cristalli osservati risultano essere costituiti da nitrato di sodio ( $\text{NaNO}_3$ ).

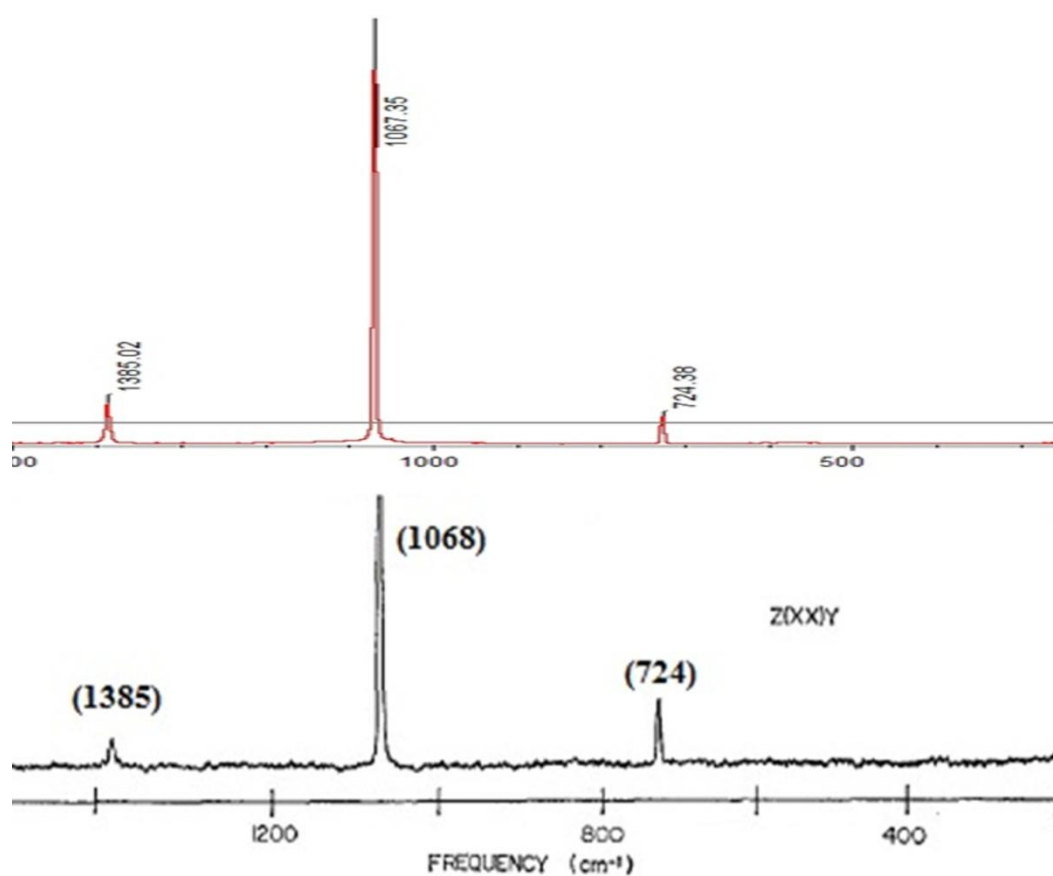


Figura 44: confronto tra spettro Raman ottenuto in questo studio (in alto) e quello del nitrato di sodio documentato in letteratura (in basso) (Rousseau D. L. et al., 1968 e Nakamoto K. et al., 2006).

La presenza di nitrato di sodio in un campione di liquido sinoviale patologico potrebbe derivare dalla decomposizione dell'acido ialuronico o di un farmaco

iniettati all'interno dell'articolazione a seguito dell'artrocentesi. Tali ipotesi, però, non sono ancora state confermate.

#### 5.4 Campione "GIB"

Osservato ad occhio nudo il campione "GIB" ha mostrato una porzione organica biancastra, che nonostante le ripetute diluizioni non si è completamente disgregata. Al microscopio ottico polarizzatore con il compensatore inserito questa porzione, prevalentemente costituita da materiale organico, si è presentata molto irregolare e ricca di corpi tondeggianti (Figura 45) aventi colori di interferenza vivaci, talvolta disposti a croce di Malta, identificati come cristalli di lipidi. In particolare, lungo il bordo sinistro della goccia disidratata sono stati osservati numerosi corpuscoli birifrangenti di forme molto varie, taluni prismatici regolari, altri più irregolari, le cui dimensioni variano da 10 a 20  $\mu\text{m}$  (Figura 46).

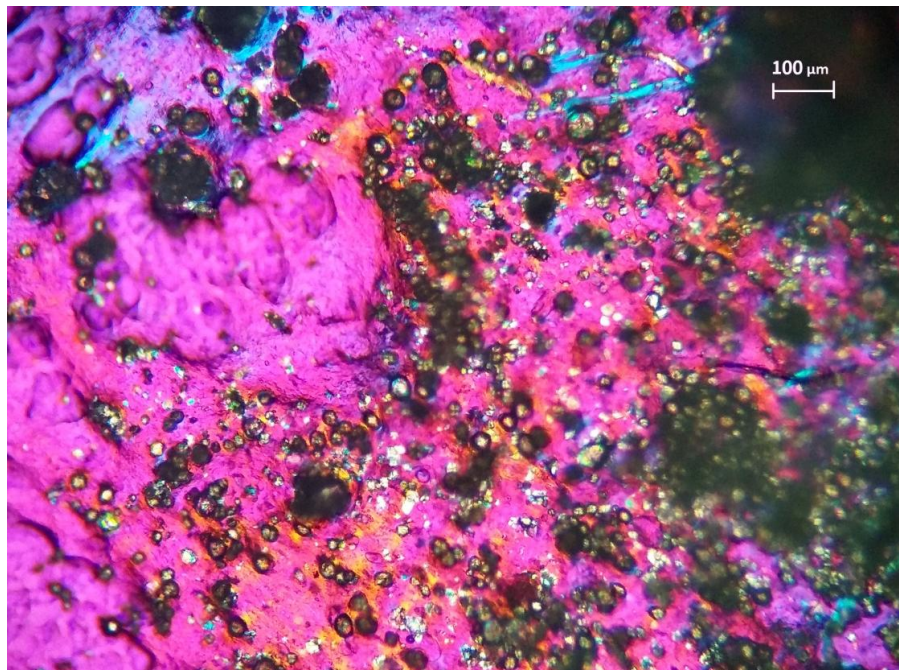


Figura 45: porzione organica del campione "GIB" a basso ingrandimento (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).

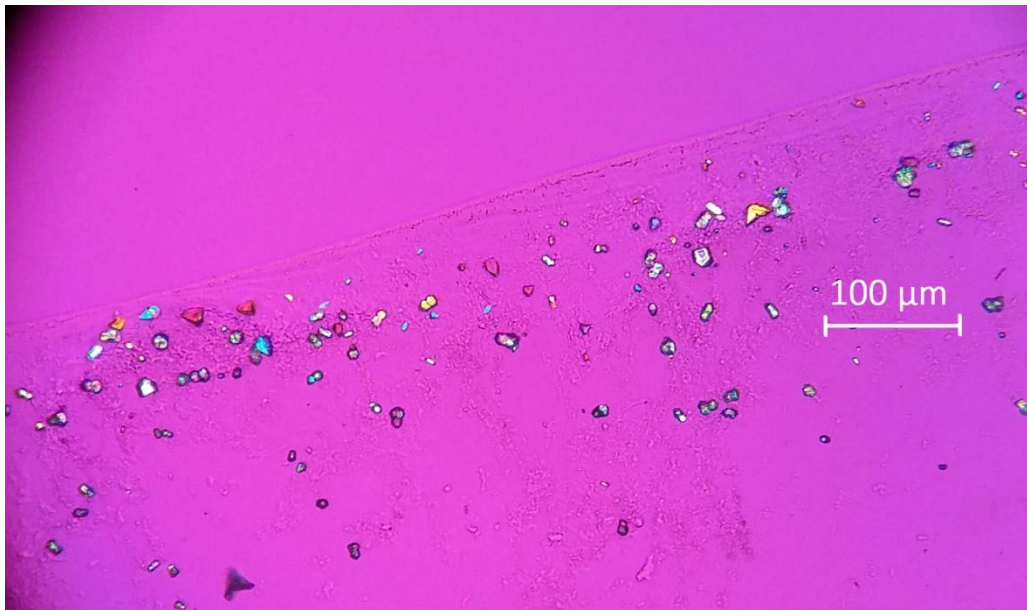
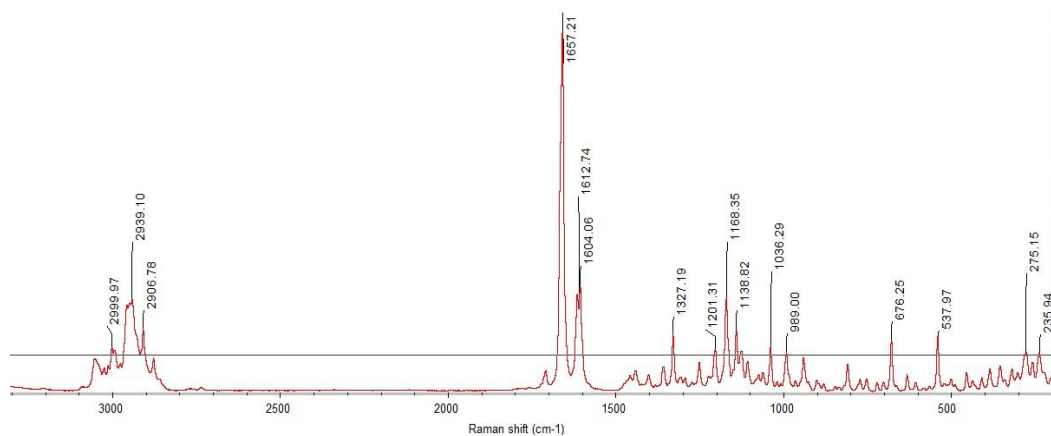


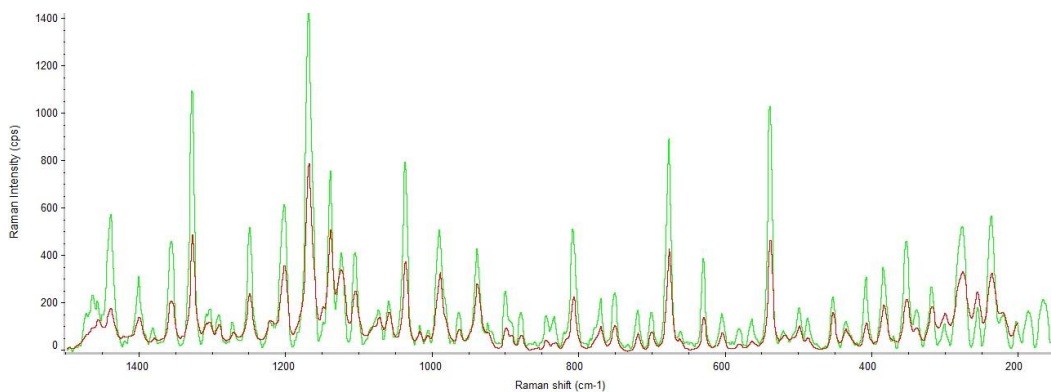
Figura 46: corpuscoli birifrangenti di diverse morfologie (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).

Successivamente i cristalli sono stati analizzati utilizzando la tecnica spettroscopica micro-Raman. Anche in questo campione, come nel caso di “GAL”, lo spettro risultante è costituito da numerose bande (Figura 47), comprese soprattutto tra valori di Raman shift di 200 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ . In particolare, i picchi principali sono posizionati a valori di Raman shift 1657, 1604, 1168, 1138, 1327  $\text{cm}^{-1}$ . Tuttavia, non è da trascurare la regione a circa 3000  $\text{cm}^{-1}$  in quanto almeno 3-4 bande sono ben visibili ed una in particolare mostra intensità importanti (es.: banda a 2939  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 47: spettro Raman dei cristalli irregolari birfrangenti osservate nel campione "GIB".**

Attraverso l'analisi dello spettro di [Figura 47](#) è stato notato che le posizioni delle bande comprese tra 200 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  combaciano perfettamente con quelle dello spettro raccolto durante l'analisi del campione "GAL", come dimostrato in [Figura 48](#).



**Figura 48: spettri Raman dei cristalli osservati nel campione "GAL" (in verde) e di quelli nel campione "GIB" (in rosso).**

Inoltre, in aggiunta agli spettri appena descritti, sono stati raccolti ulteriori spettri costituiti da bande diverse rispetto ai primi, ed in particolare i picchi principali risultano posizionati a valori di Raman shift di 1085, 280 e 712  $\text{cm}^{-1}$  ([Figura 49](#)). Tali valori corrispondono normalmente a quelli della calcite.

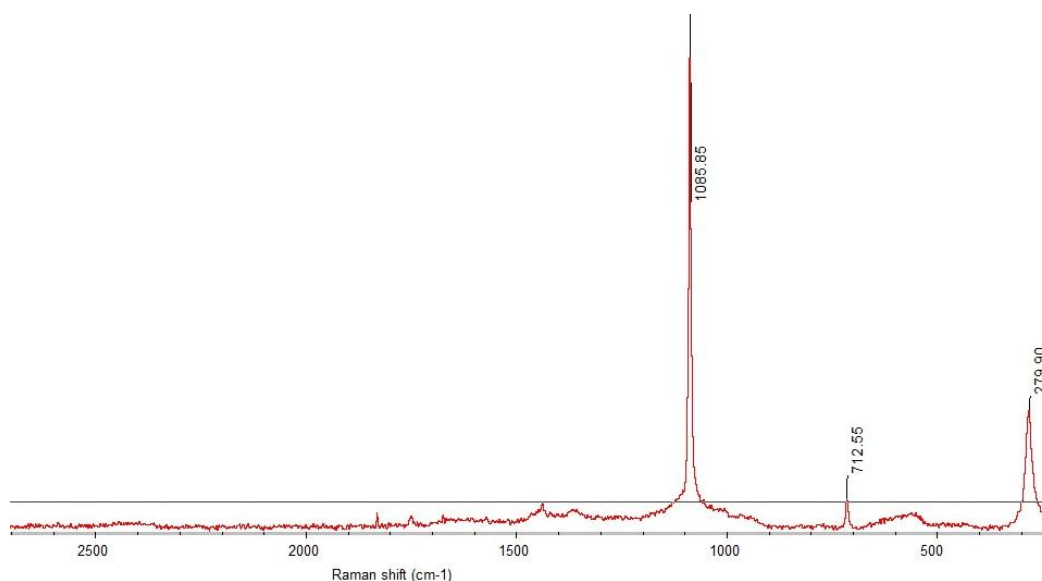


Figura 49: spettro Raman di alcuni cristalli irregolari birfrangenti osservati nel campione "GIB".

Al fine di confermare l'identificazione degli spettri Raman acquisiti, il campione "GIB" è stato osservato attraverso l'ausilio del SEM. Si è riusciti a trovare esattamente la stessa area già esaminata al microscopio ottico, di conseguenza si sono potute studiare le caratteristiche di ogni cristallo osservato (Figura 50).

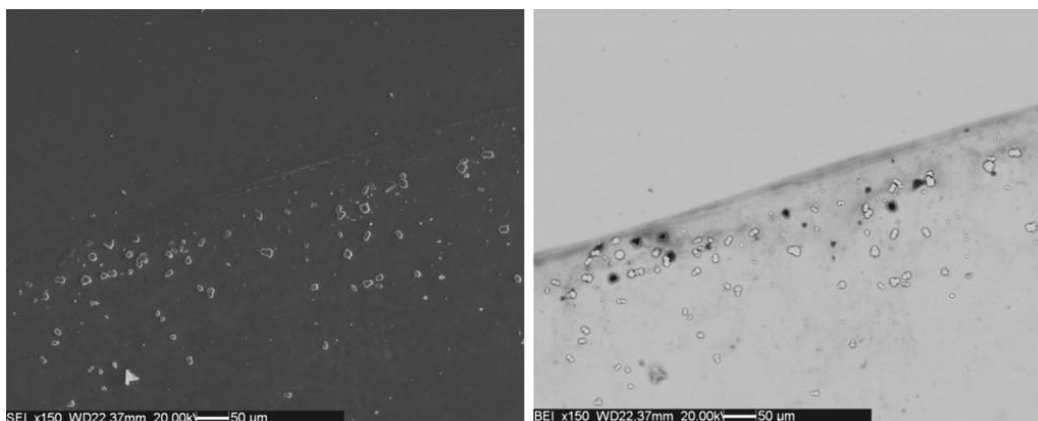


Figura 50: immagine SEM del campione "GIB", a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 150 ingrandimenti.

Come si osserva nell'immagine a destra di Figura 50 è possibile notare che alcuni cristalli presentano una tonalità scura, mentre altri presentano una tonalità chiara; tale caratteristica indica evidentemente che le due tipologie di cristalli



sono composizionalmente differenti. L'analisi EDS ha mostrato che i cristalli scuri sono costituiti prevalentemente da carbonio e ossigeno, come riportato nello spettro di [Figura 51](#), mentre quelli chiari sono risultati composti quasi interamente da calcio, carbonio e ossigeno ([Figura 52](#)). Combinando le informazioni di spettroscopia vibrazionale e l'analisi EDS è stato possibile affermare con una certa sicurezza che i cristalli chiari siano costituiti da calcite.

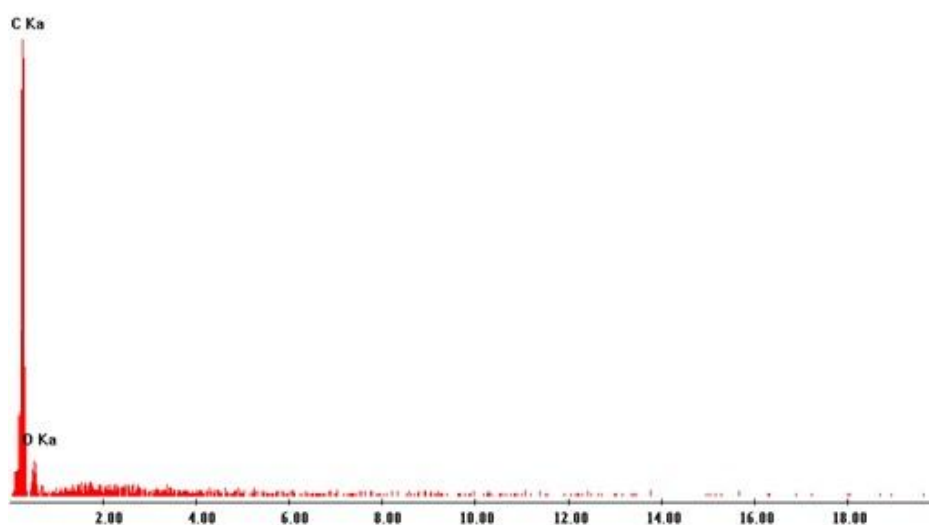


Figura 51: spettro EDS dei cristalli che appaiono scuri nell'immagine a destra di Figura 50.

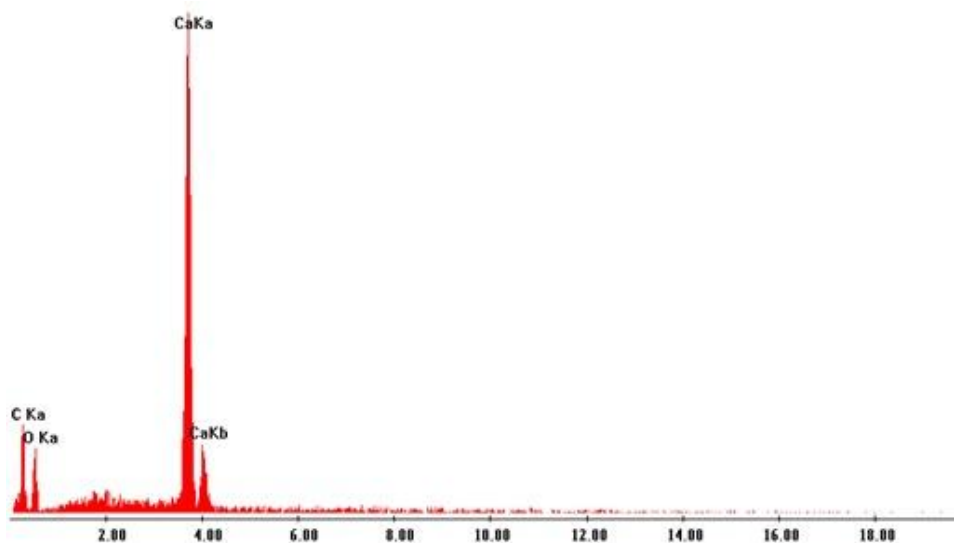
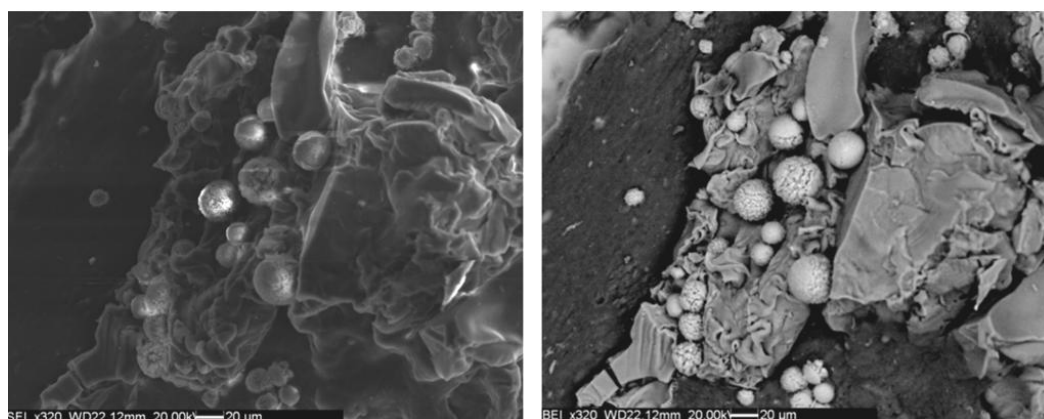


Figura 52: spettro EDS dei cristalli che appaiono chiari nell'immagine a destra di Figura 50.

In [Figura 53](#) sono riportati ulteriori cristalli che mostrano la stessa composizione riportata dallo spettro EDS in [Figura 52](#). Come appare evidente, i cristalli di calcite presenti nel campione studiato mostrano diverse morfologie, da piccoli cristalli squadrati ad aggregati irregolari fino a tondeggianti.



**Figura 53: immagine SEM del campione “GIB”, a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 150 ingrandimenti.**

Pur documentata in rari casi nell’organismo umano, la presenza di calcite all’interno di liquido sinoviale patologico è senz’altro un argomento che richiede ulteriori approfondimenti.

### 5.5 Campione “PFCD”

All’interno del campione “PFCD” è stato possibile osservare, con l’ausilio del microscopio ottico polarizzatore, diverse masse opache irregolari contenenti un’elevata quantità di cristalli birifrangenti dall’abito prismatico allungato di dimensioni relativamente ridotte, in media attorno agli 8  $\mu\text{m}$  ([Figura 54](#)). Inoltre, lungo il bordo della goccia disidratata si è osservata una moltitudine di cristalli che presentano una morfologia quasi rotondeggiante, dalle dimensioni assai ridotte, osservabili come puntini birifrangenti ([Figura 55](#)).

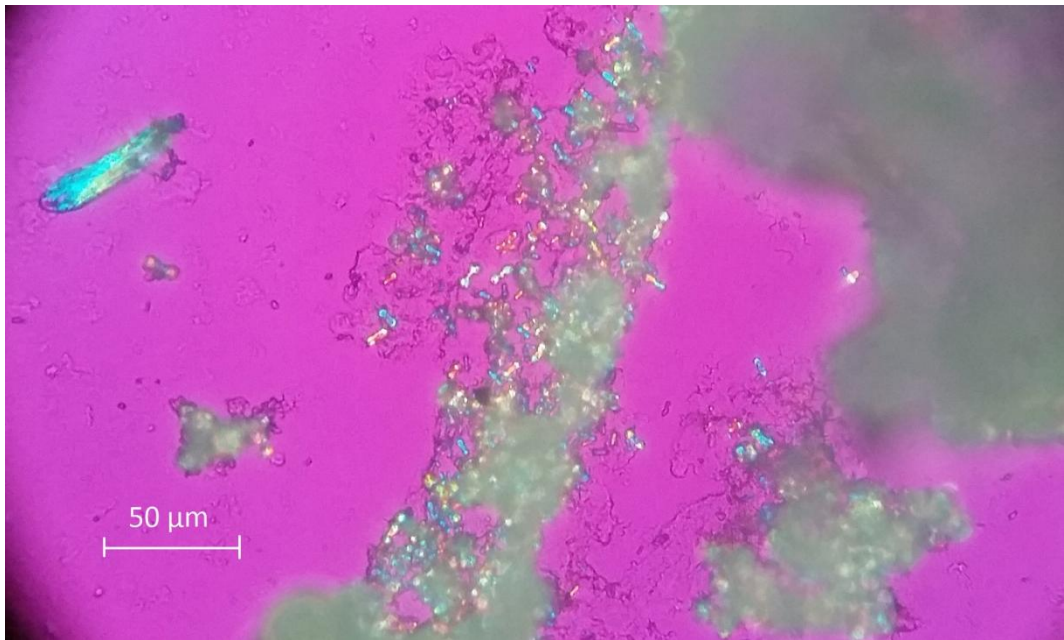


Figura 54: cristalli prismatici birfrangenti all'interno di una massa opaca irregolare nel campione "PFCD" (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).

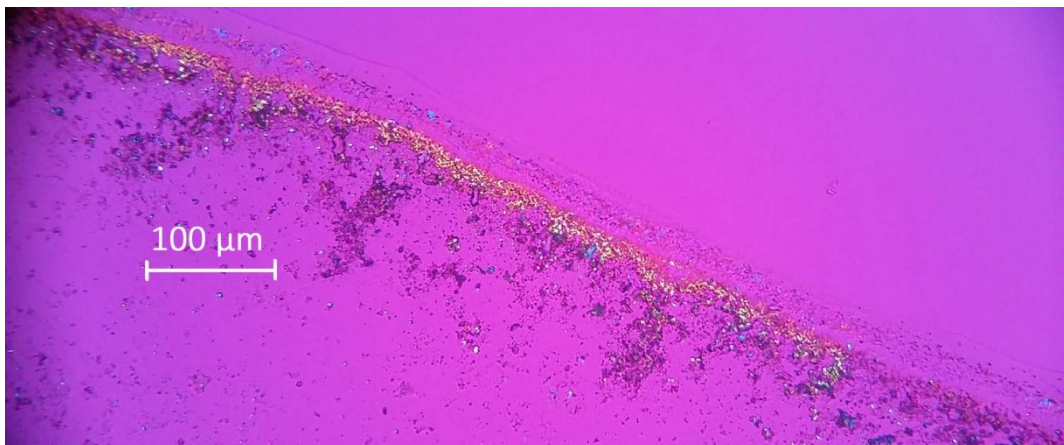
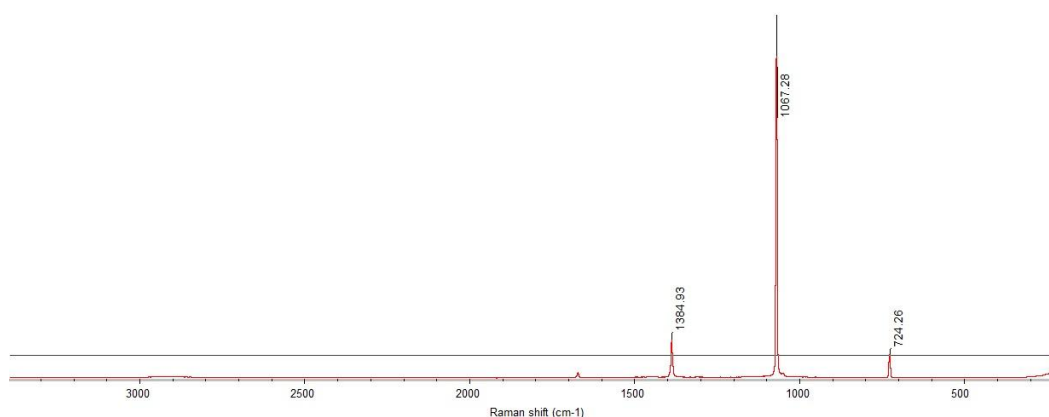


Figura 55: cristalli birfrangenti osservati lungo il bordo della goccia disidratata nel campione "PFCD" (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).

Successivamente, su alcuni cristalli sono state condotte analisi micro-Raman. Anche in questo campione, come nel campione “BUS”, gli spettri risultanti sono costituiti da bande assai nette, posizionate a valori di Raman shift 1067, 1385, 724  $\text{cm}^{-1}$ . Confrontando gli spettri Raman acquisiti da questo campione con quelli del campione “BUS” e quelli individuati in letteratura (*Rousseau D. L. et al.*, 1968 e *Nakamoto K. et al.*, 2008), viene confermata la presenza di nitrato di sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) anche in questo campione.



**Figura 56: spettro Raman di alcuni cristalli prismatici tozzi osservati nel campione “PFCD”.**

Per confermare i risultati ottenuti il campione “PFCD” è stato analizzato al SEM. In [Figura 57](#) è possibile osservare l’elevatissima quantità di cristalli presenti all’interno del campione “PFCD”. Le morfologie che si possono osservare sono assai varie, da globulari (singole, doppie o “a manubrio”, talvolta multiple) fino ad aciculari, spesso aggregati a ciuffi e covoni.

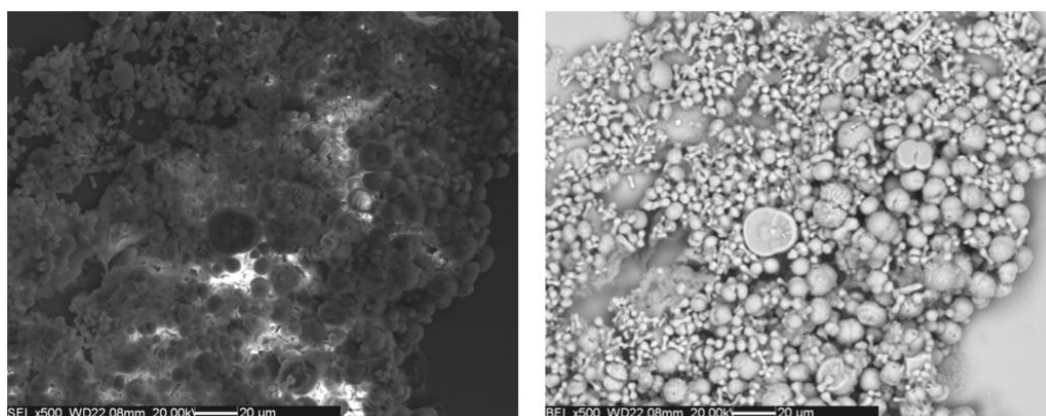


Figura 57: immagine SEM del campione "PFCD", a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 500 ingrandimenti.

La composizione chimica dei cristalli osservati in questa porzione del campione "PFCD", ottenuta attraverso la tecnica EDS, è risultata essere prevalentemente calcio, carbonio e ossigeno, com'è possibile constatare dallo spettro di Figura 58.

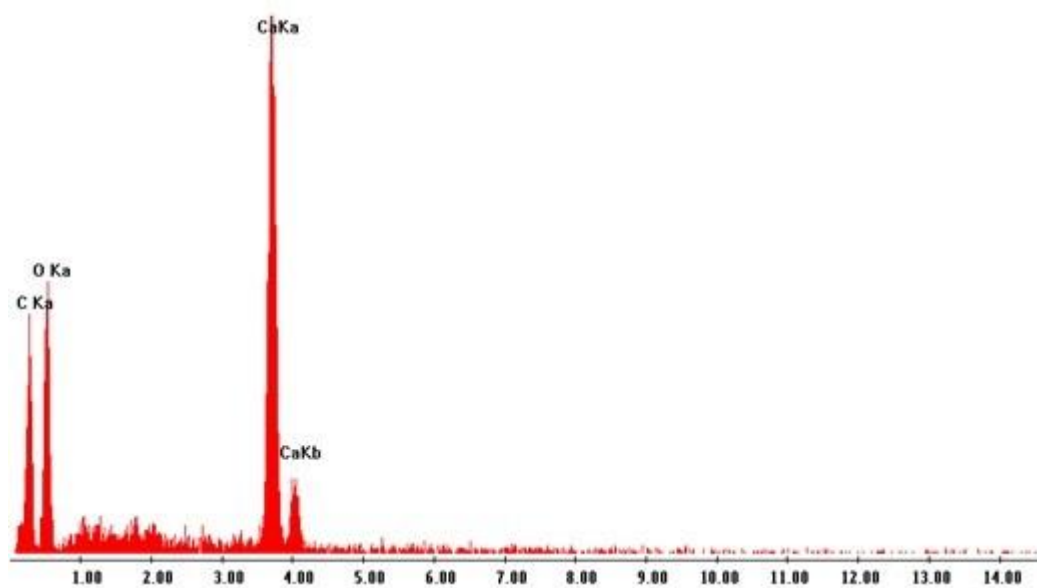


Figura 58: spettro EDS dei cristalli osservabili in Figura 57.

Inoltre, in Figura 59 è possibile osservare al centro dell'immagine una fibra organica (molto scura ai BSE), quasi completamente ricoperta da cristalli, che risultano essere costituiti prevalentemente da calcio, come risulta dallo spettro riportato in Figura 60.

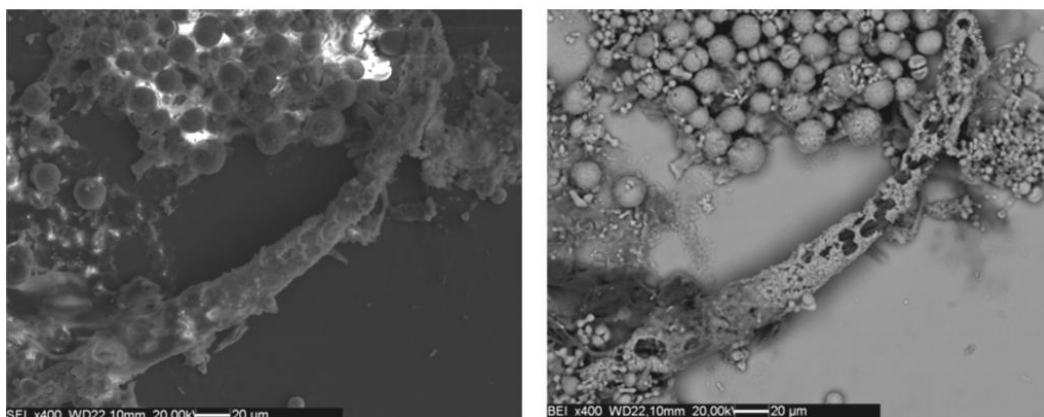


Figura 59: immagine SEM di una fibra organica ricoperta da cristalli di calcio all'interno del campione "PFCD", a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 400 ingrandimenti.

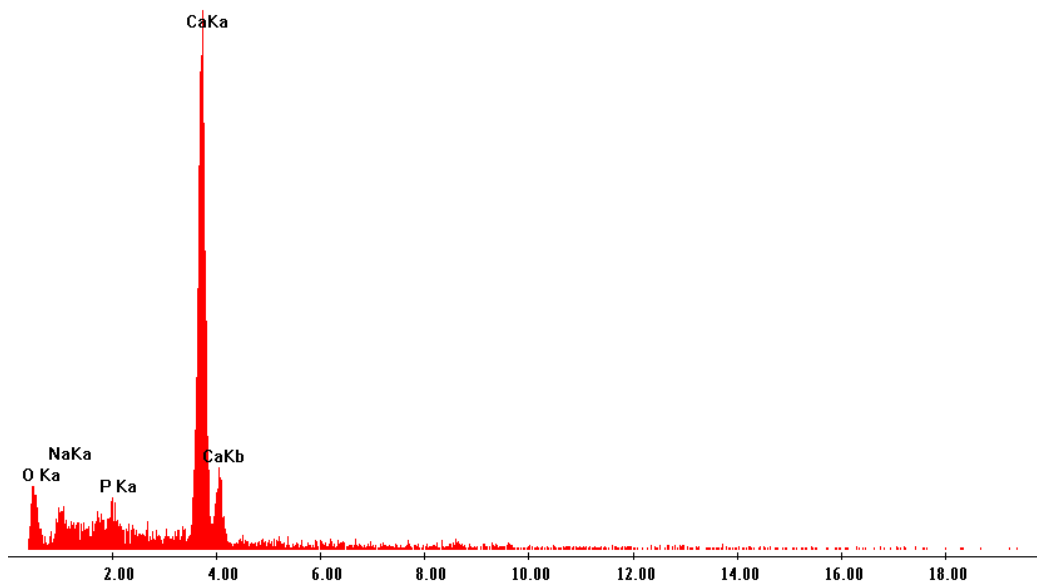


Figura 60: spettro EDS dei cristalli che ricoprono la fibra organica di Figura 59.

Oltre a queste tipologie di cristalli sono stati osservati rari esemplari di cristalli con abito prismatico allungato; uno di questi cristalli è cerchiato in giallo in Figura 61.

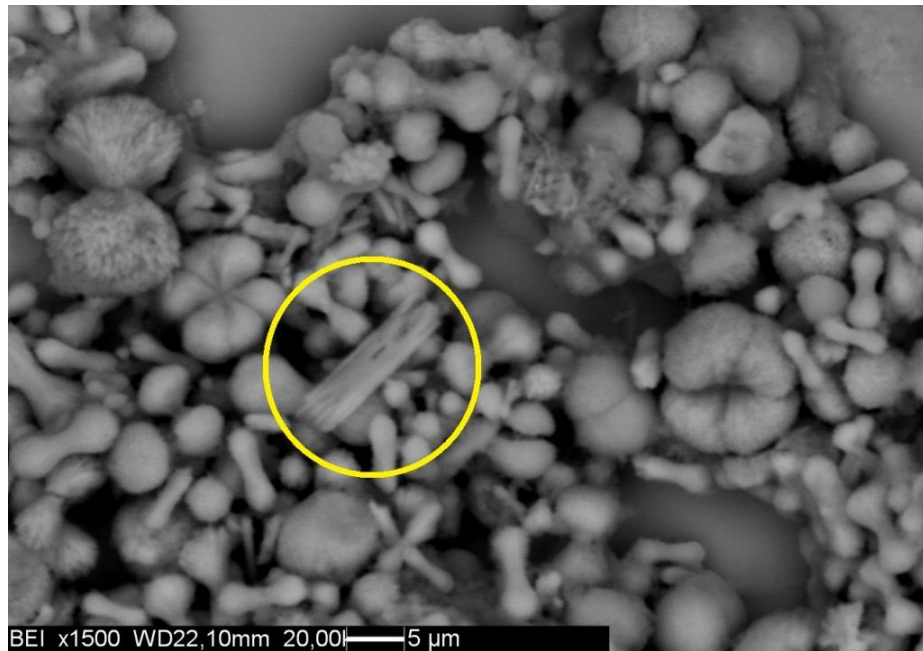


Figura 61: immagine SEM ottenuta in BSE a 1500 ingrandimenti. Il cristallo cerchiato è stato analizzato mediante spettrometria EDS e il relativo spettro è rappresentato in Figura 62.

Analisi EDS condotte su questo cristallo hanno evidenziato la prevalenza di fosforo e calcio, risultato che ha confermato la presenza, seppur limitata, di pirofosfato di calcio all'interno di tale campione.

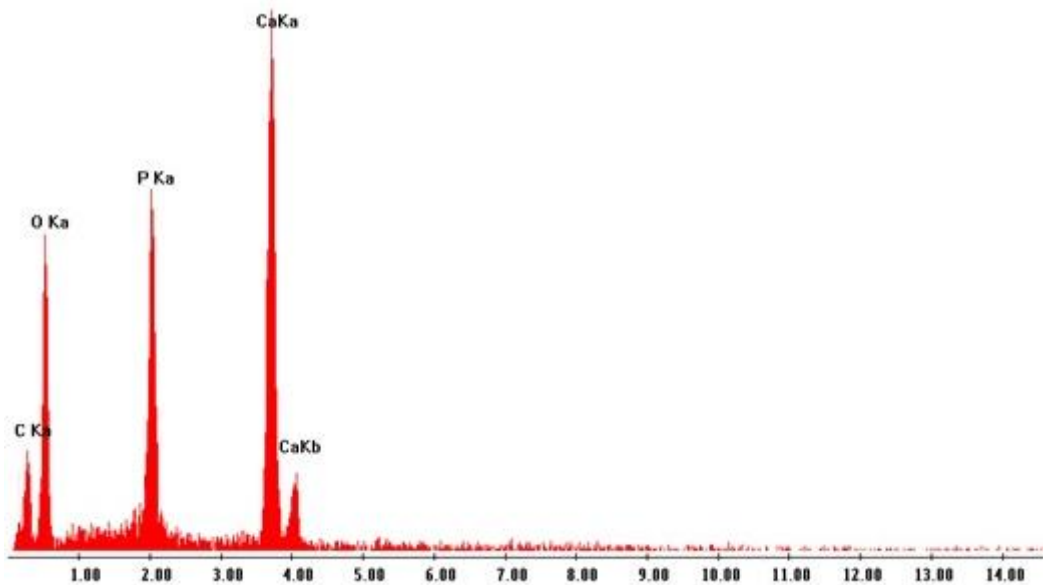


Figura 62: spettro EDS del cristallo cerchiato in Figura 61.

Ulteriori cristalli analizzati sono risultati essere composti in prevalenza da sodio e ossigeno (Figura 64). Tali cristalli, di cui un esempio è osservabile all'intero del cerchio in Figura 63, hanno presentato un abito prismatico tozzo. La composizione chimica di tali cristalli, ricavata attraverso la tecnica EDS, ha confermato i risultati degli spettri Raman precedentemente acquisiti dimostrando che tali cristalli sono costituiti da nitrato di sodio. Il silicio nello spettro EDS appartiene al vetro del supporto su cui giace il campione.

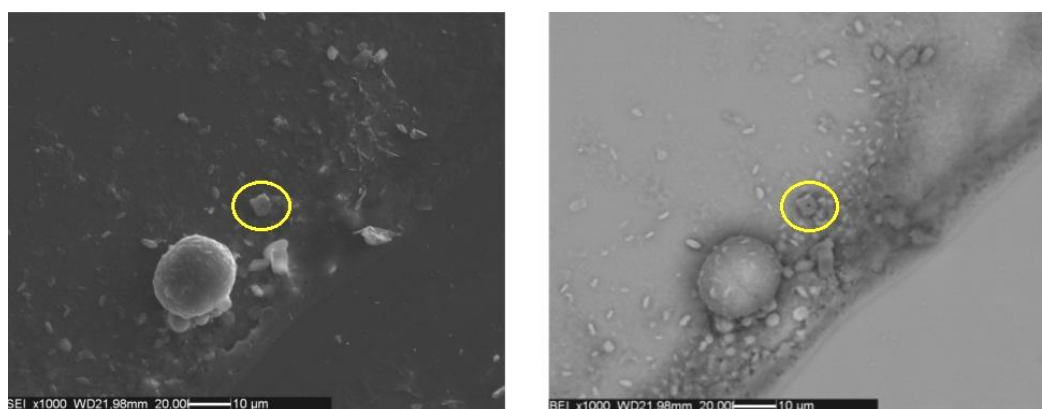


Figura 63: immagine SEM del campione "PFCD", a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 1000 ingrandimenti. Il cristallo cerchiato è stato analizzato mediante spettrometria EDS e il relativo spettro è rappresentato in Figura 64.

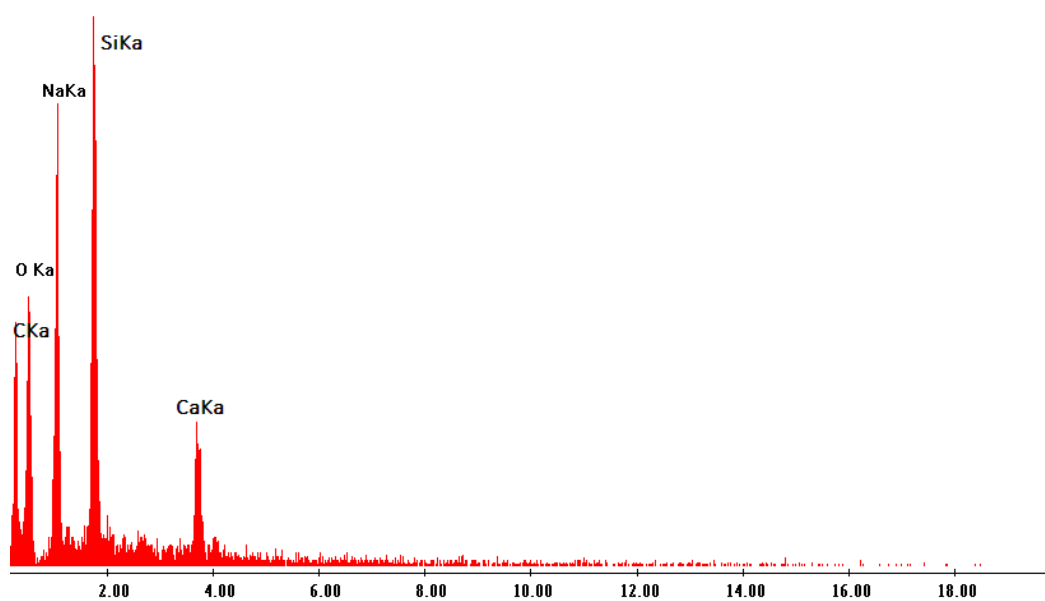
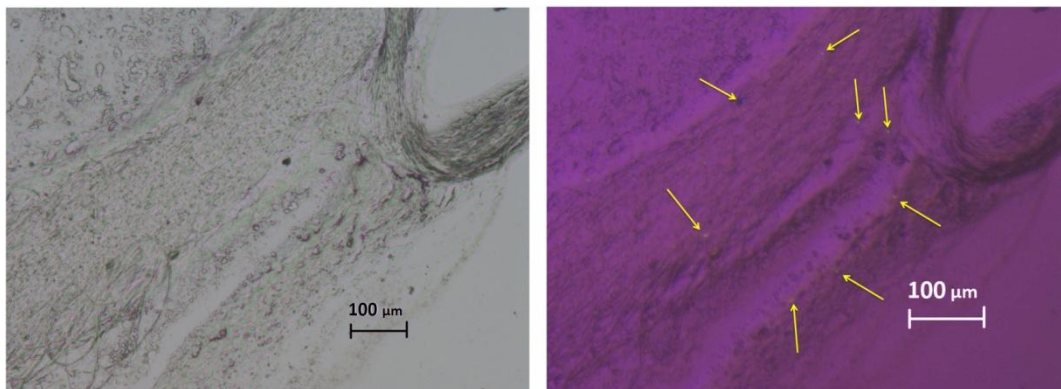


Figura 64: spettro EDS del cristallo cerchiato in Figura 63.



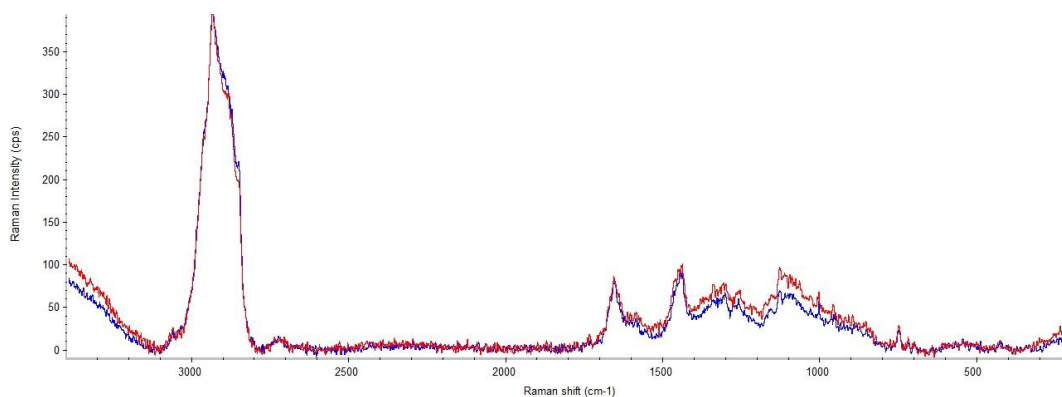
## 5.6 Campione "1MN"

Come descritto precedentemente nel capitolo 4.3 il campione 1MN è stato suddiviso in due provette, in una delle quali è stato aggiunto l'enzima ialuronidasi. Nonostante la diversa preparazione, i campioni, osservati al microscopio ottico polarizzatore, non hanno mostrato differenze evidenti. In entrambi i campioni si è potuto osservare una fitta maglia di fibrina ed altri composti organici che ha reso assai difficoltosa l'osservazione e l'analisi dei cristalli. Il quantitativo di cristalli birifrangenti presenti nel campione si è rivelato decisamente scarso e questi, osservabili con difficoltà nell'immagine a destra di [Figura 65](#) indicati dalle frecce gialle, si trovano intrappolati all'interno della fitta rete di materiale organico.



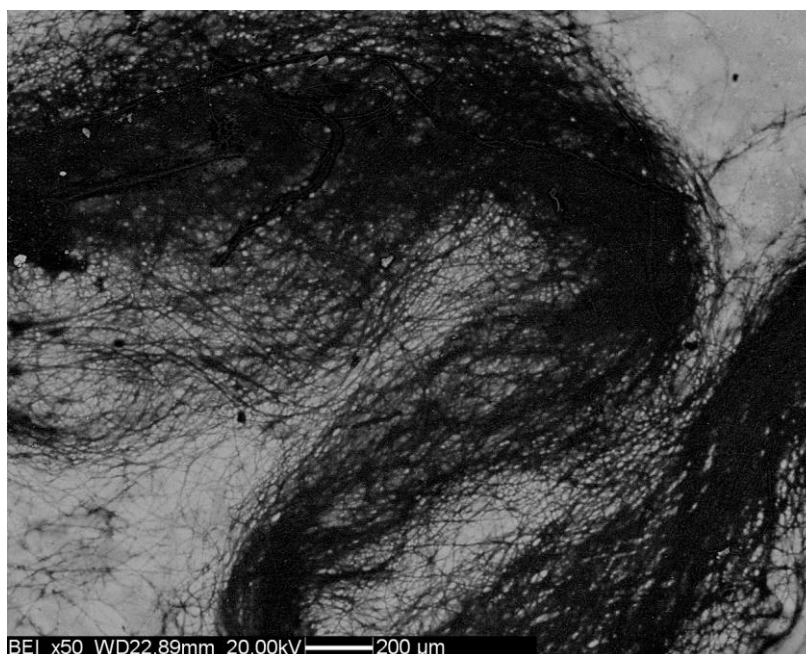
**Figura 65:** immagine al microscopio ottico polarizzatore, a nicols paralleli a sinistra e a nicols incrociati e con compensatore inserito a destra; per dettagli sui cristalli evidenziati dalle frecce vedere testo.

Dalle successive analisi condotte attraverso la spettroscopia micro-Raman dei cristalli osservati al microscopio ottico sono stati ricavati spettri caratterizzati da picchi estremamente ampi, tipici di sostanza amorfa, che ricalcano quasi perfettamente altri spettri acquisiti in porzioni dello stesso campione costituite da sola sostanza organica ([Figura 66](#)). Purtroppo è risultato impossibile estrarre i cristalli dalla fibrina per ottenerne uno spettro.



**Figura 66: spettro Raman della fibrina (in rosso) e del cristallo (in blu).**

I cristalli sono quindi stati ulteriormente analizzati attraverso il SEM, al fine di chiarirne la natura. Tuttavia, anche attraverso l'ausilio di tale strumento, l'individuazione dei cristalli è risultata difficoltosa a causa del grande quantitativo di materia organica fibrosa presente nel campione, come appare evidente dall'immagine in [Figura 67](#). Alcuni cristalli, con abito prismatico più o meno allungato, sono stati tuttavia individuati attraverso le immagini ad elettroni retrodiffusi ([Figura 68](#)) ed identificati come pirofosfati di calcio mediante la microanalisi EDS.



**Figura 67: immagine SEM in elettroni retrodiffusi a 50 ingrandimenti delle maglie di fibrina nel campione "1MN".**

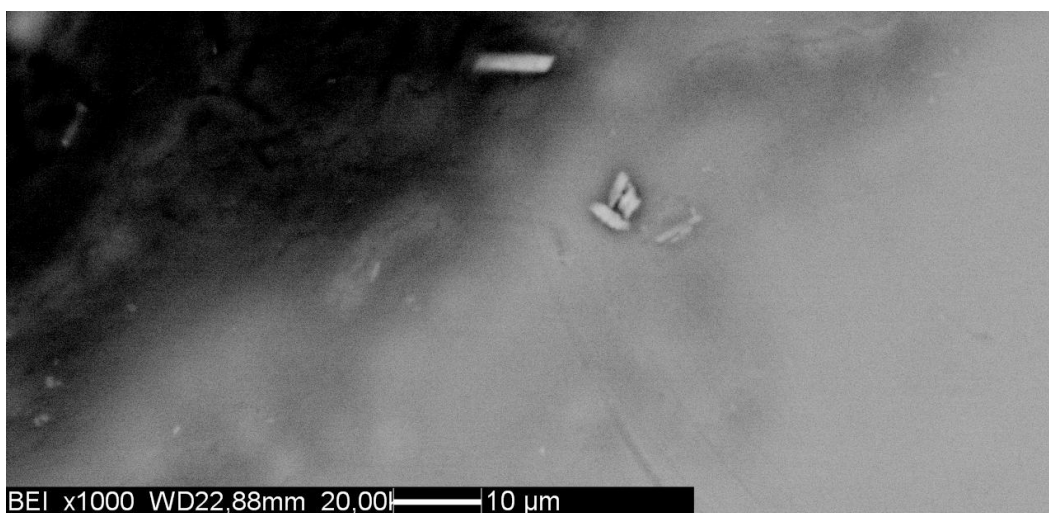


Figura 68: immagine SEM in elettroni retrodiffusi a 1000 ingrandimenti dei cristalli di fosfato di calcio.

In Figura 69 risulta chiaro come anche le analisi chimiche condotte attraverso la tecnica EDS abbiano coinvolto inevitabilmente la materia organica circostante ai cristalli. Nello spettro infatti è possibile osservare fosforo, calcio e ossigeno, propri dei cristalli, il carbonio derivante dalla materia organica e il silicio, il sodio e parte del calcio appartenenti al vetrino.

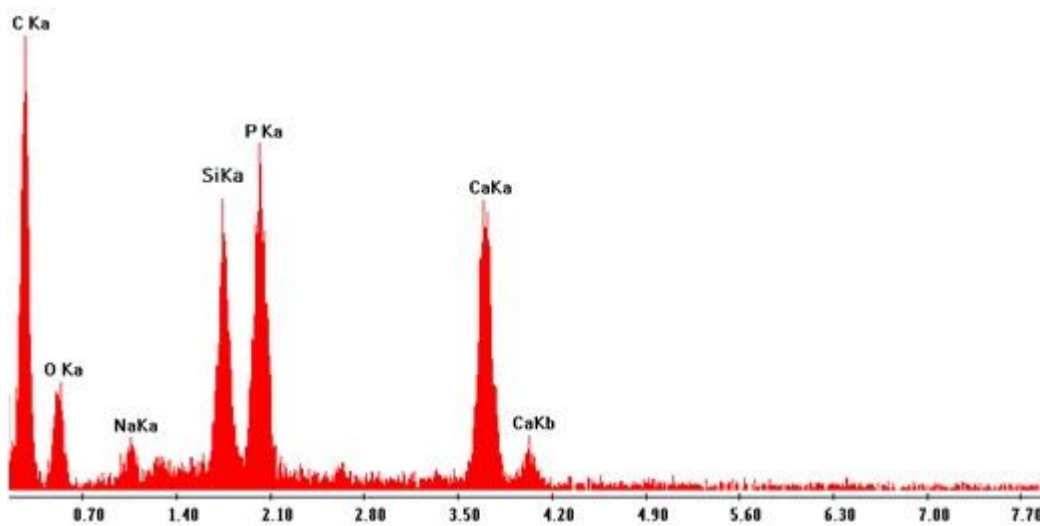
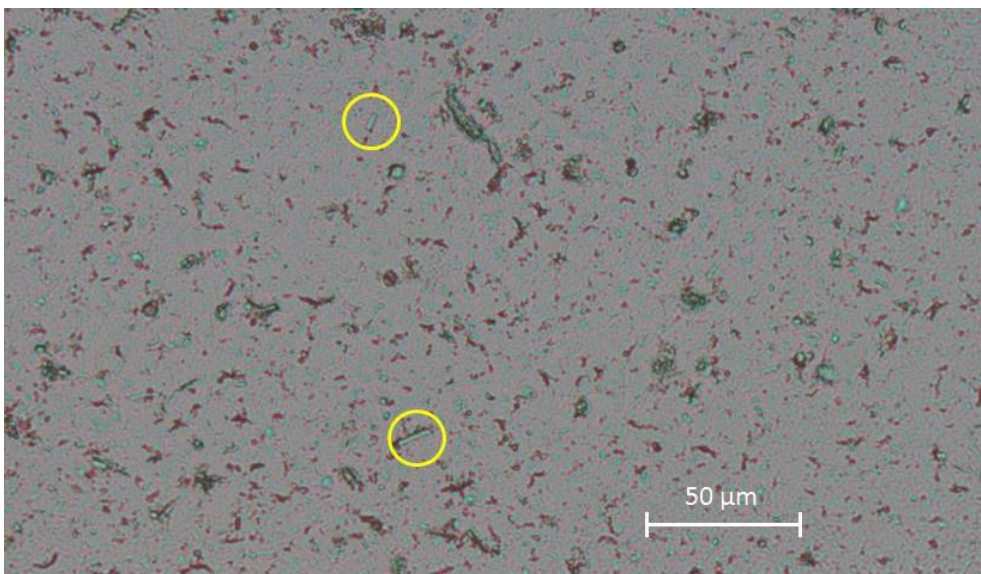


Figura 69: spettro EDS di un cristallo di fosfato di calcio; il carbonio appartiene alla materia organica attorno al cristallo.

## 5.7 Campione "2PAM"

Anche il campione "2PAM", come "1MN", è stato diviso in due provette aggiungendo l'enzima ialuronidasi ad una delle due. Anche in questo caso osservando i campioni al microscopio ottico polarizzatore non sono state notate differenze, nonostante la diversa preparazione. Studiando il campione "2PAM" a nicols paralleli è stato possibile notare alcuni corpuscoli prismatici allungati (Figura 70), che però a nicols incrociati non hanno presentato alcuna birifrangenza. Con il compensatore inserito, invece, è possibile osservare una serie di cristalli molto più piccoli, con abito prismatico tozzo, visibili come puntini birifrangenti in Figura 71.



**Figura 70: immagine al microscopio ottico polarizzatore a nicols paralleli del campione "2PAM" (per dettagli sui cristalli cerchiati vedere testo).**

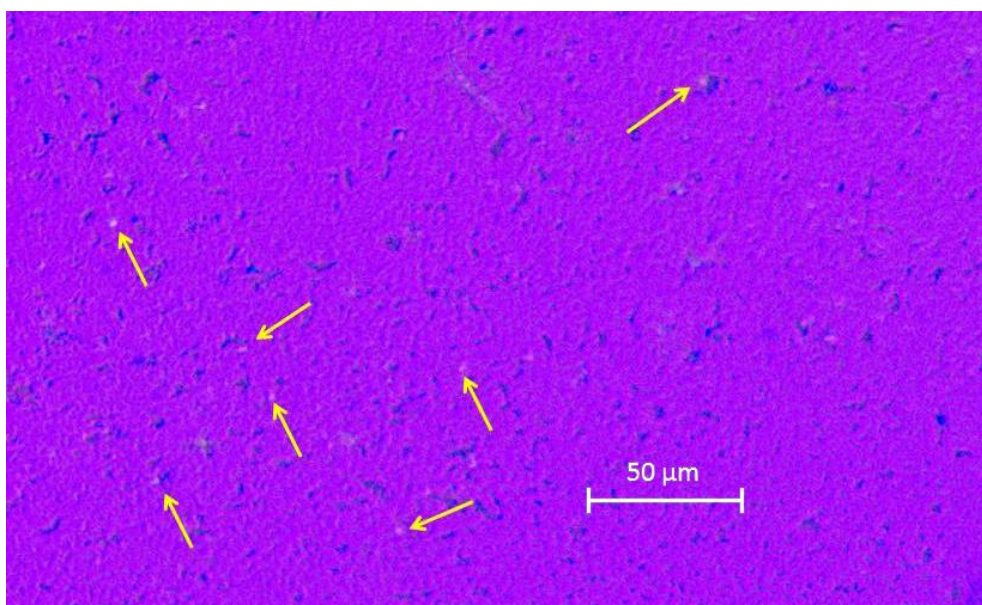


Figura 71: immagine della stessa porzione di campione di Figura 70, al microscopio ottico polarizzatore con il compensatore inserito; indicati dalle frecce una serie di piccoli cristalli birifrangenti (per dettagli sui cristalli evidenziati dalle frecce vedere testo).

I cristalli osservati attraverso il microscopio ottico sono poi stati studiati per mezzo della spettroscopia micro-Raman. Dalle analisi spettroscopiche è stata ricavata una serie di spettri i cui picchi principali risultano posizionati a valori di Raman shift di 1049, 756, 357  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 72). Questi tre picchi sono caratteristici anche dello spettro del pirofosfato di calcio diidrato (Figura 23). Le bande presenti nel range di valori di Raman shift compreso tra 2800 a 3100  $\text{cm}^{-1}$  e alcuni dei picchi presenti ad altri valori di Raman shift appartengono molto probabilmente alla materia organica, che può venire irraggiata dal laser in quanto i cristalli studiati presentano spessori e dimensioni ridotti.

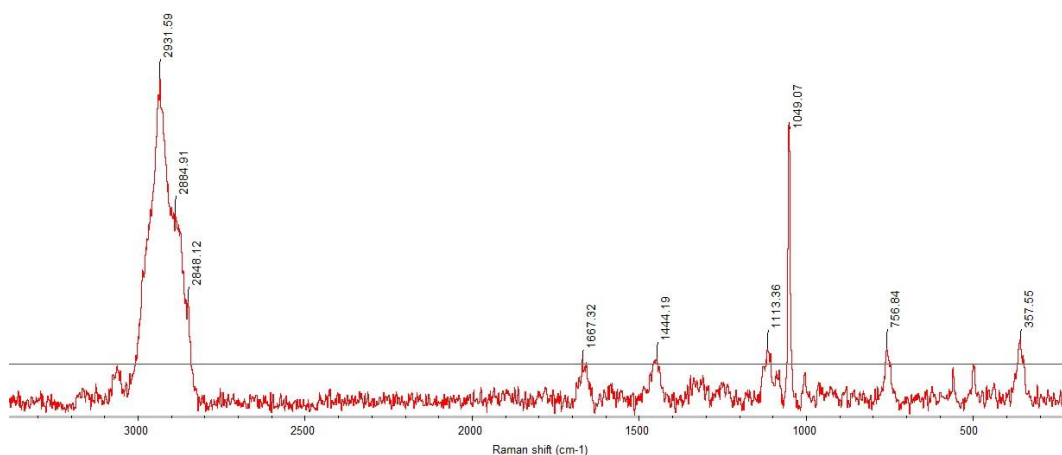


Figura 72: spettro Raman di un cristallo del campione "2PAM".

Per confermare la natura dei cristalli osservati all'interno del campione "2PAM" sono state condotte analisi SEM. Osservando le immagini acquisite attraverso il SEM il campione appare straordinariamente ricco in cristalli, come si può notare dall'immagine in elettroni retrodiffusi di Figura 73 e Figura 74. In Figura 75 è possibile osservare un cristallo di pirofosfato di calcio isolato. Tale abbondanza di cristalli non era stata riconosciuta osservando il campione per mezzo del microscopio ottico polarizzatore, in quanto le loro ridotte dimensioni non hanno permesso percepirne la loro caratteristica birifrangenza. Tale fattore sottolinea l'importanza di analizzare i vari campioni attraverso l'utilizzo di più metodologie analitiche differenti.

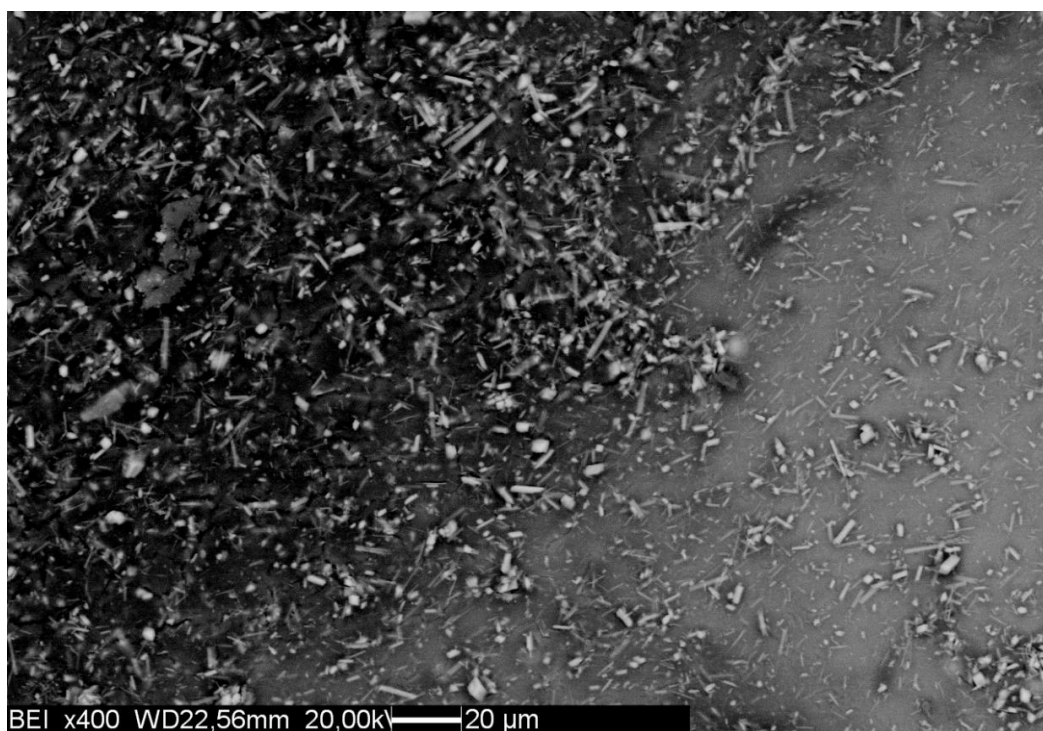


Figura 73: immagine SEM in elettroni retrodiffusi a 400 ingrandimenti del campione "2PAM".

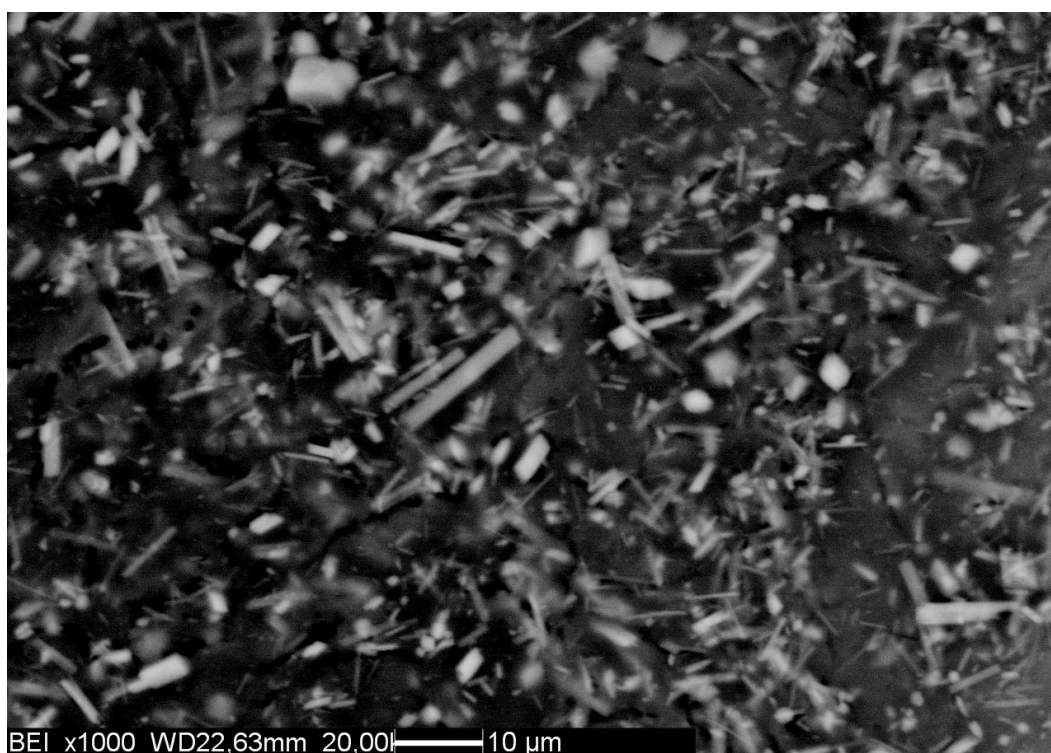


Figura 74: immagine SEM in elettroni retrodiffusi a 1000 ingrandimenti di una zona dell'immagine in Figura 73.

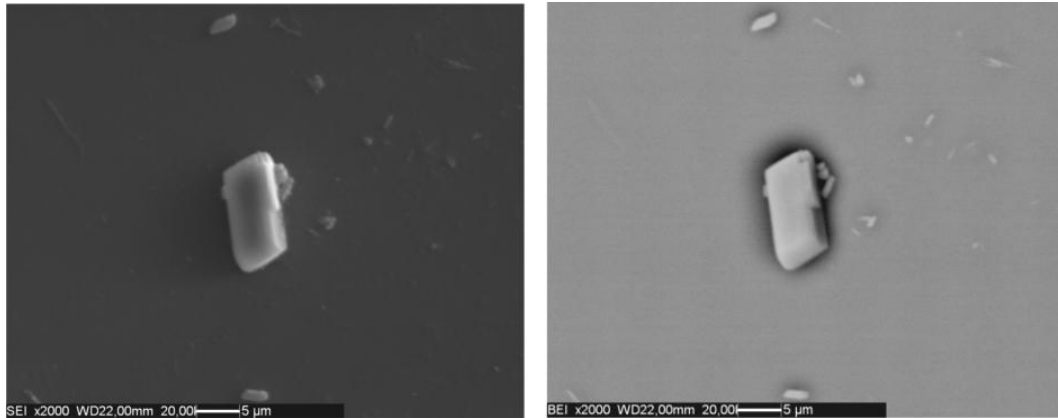


Figura 75: immagine SEM di un cristallo di fosfato di calcio, a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 2000 ingrandimenti.

Analizzando i cristalli osservati attraverso la tecnica EDS essi sono risultati essere composti prevalentemente da fosforo, calcio e ossigeno (Figura 76), confermando i risultati ottenuti attraverso la spettroscopia micro-Raman.

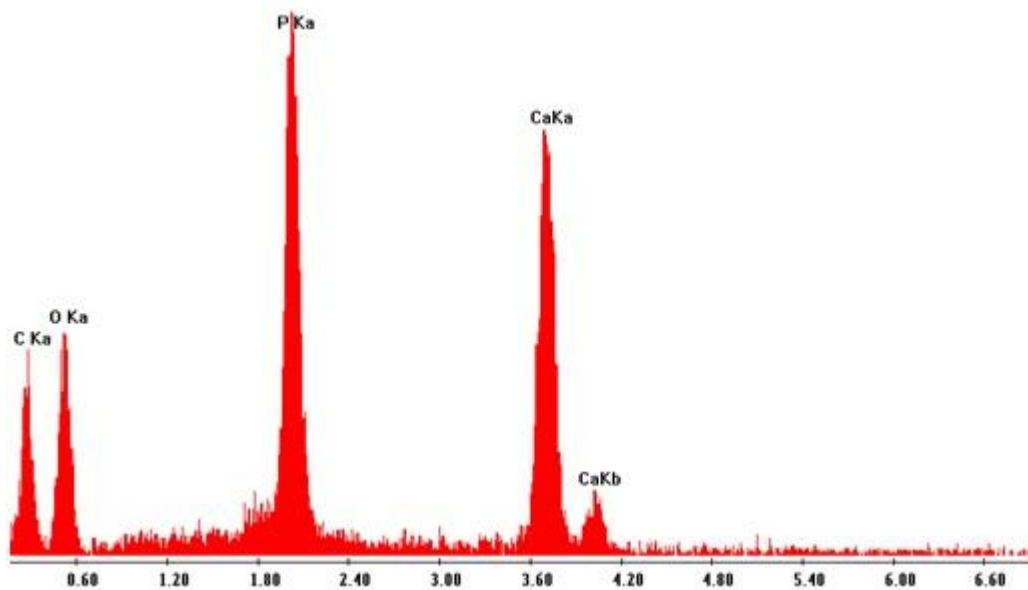


Figura 76: spettro EDS dei cristalli osservati nel campione "2PAM".



## 5.8 Campione “3PIZ”

Come i precedenti due campioni anche il campione “3PIZ” è stato trattato con l’enzima ialuronidasi e le due porzioni non hanno presentato differenze malgrado il diverso trattamento. Tuttavia, il campione “3PIZ” si è rivelato al microscopio ottico polarizzatore più interessante dei campioni “1MN” e “2PAM”, trattati analogamente. Infatti, osservandolo al microscopio, sono stati individuati numerosi cristalli prismatici, da allungati a tozzi, birifrangenti a nicols incrociati i quali hanno mostrato una birifrangenza positiva con il compensatore inserito (Figura 77). Tuttavia, anche in questo campione è presente una serie di maglie di fibrina che trattengono i cristalli e ne impediscono l’estrazione per un’analisi precisa attraverso altre tecniche analitiche.

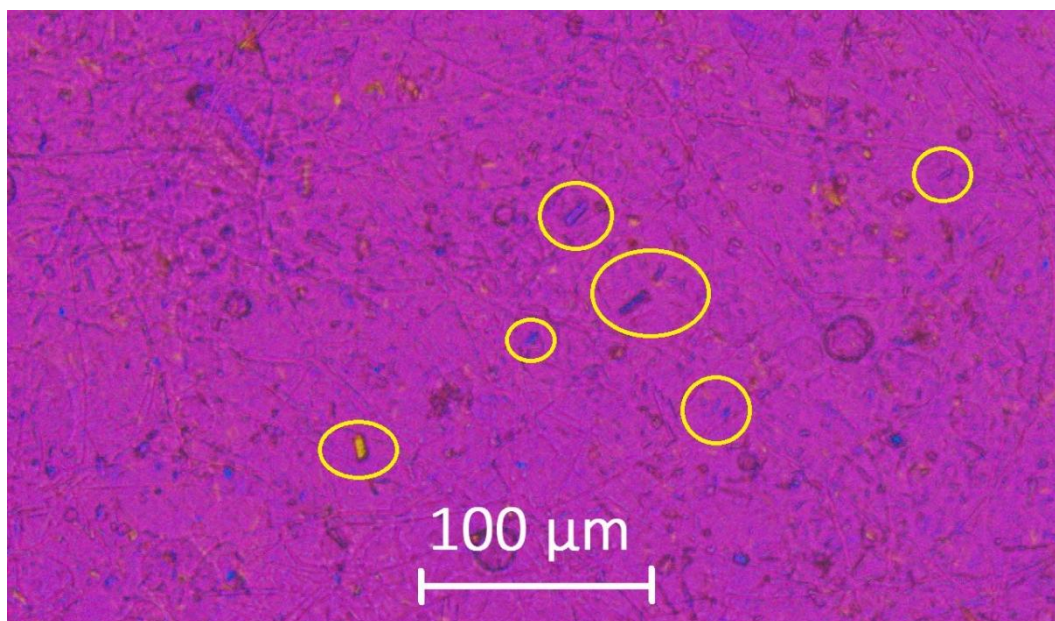


Figura 77: cerchiati alcuni cristalli che presentano birifrangenza positiva (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore); per dettagli vedere testo.

Tali cristalli birifrangenti sono stati successivamente analizzati in spettroscopia micro-Raman. Gli spettri risultanti presentano una serie di picchi, tra cui i principali sono collocati a valori di Raman shift di 1049, 755, 360  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 78), i quali risultano appartenere allo spettro Raman del pirofosfato di calcio diidrato.

Come osservato negli spettri raccolti dal campione "2PAM" anche in questi spettri sono presenti bande tra 2800 e 3100  $\text{cm}^{-1}$  ed in altri valori di Raman shift dello spettro non corrispondenti a quelle del pirofosfato di calcio. Come dedotto per il campione "2PAM" queste bande sono caratteristiche della materia organica che è stata inevitabilmente irradiata dal raggio laser a causa delle ridotte dimensioni dei cristalli.

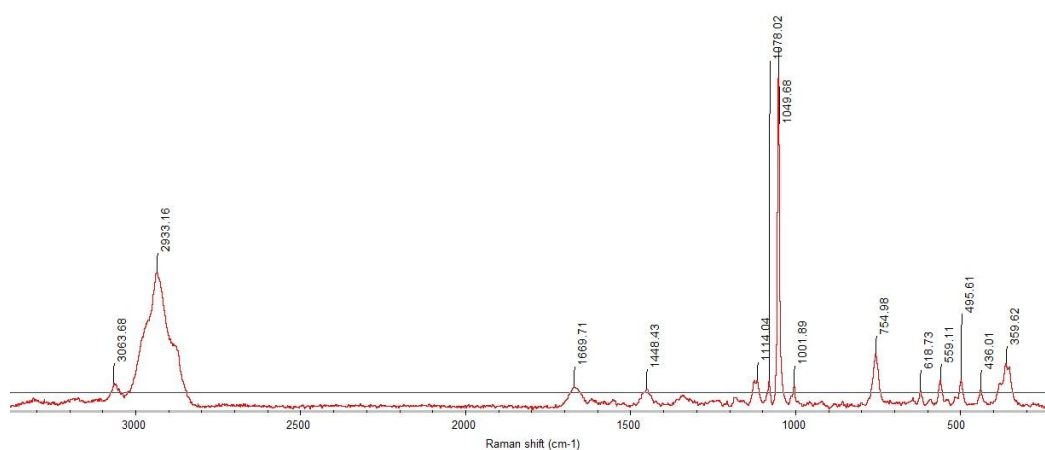


Figura 78: spettro Raman di un cristallo del campione "3PIZ".

Al fine di confermare i risultati ottenuti in spettroscopia Raman sui cristalli analizzati sono state eseguite analisi SEM. Anche all'interno del campione "3PIZ" è stato possibile osservare una quantità importante di cristalli, caratterizzati da abito prismatico allungato. In Figura 79 è possibile constatare come nell'immagine acquisita in elettroni secondari i cristalli siano pressoché invisibili, ricoperti da una patina di materia organica che li occulta, mentre nell'immagine in elettroni retrodiffusi i cristalli appaiono chiaramente visibili.

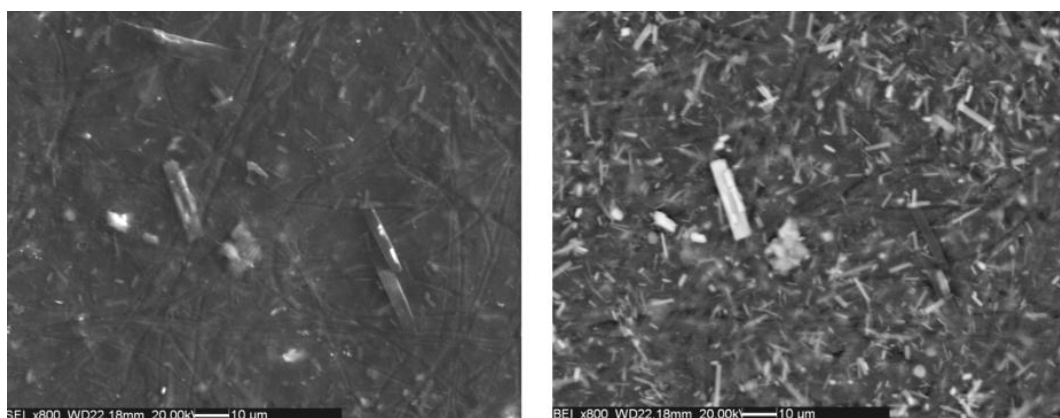


Figura 79: immagine SEM del campione "3PIZ", a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 800 ingrandimenti.

Come dimostrazione dei risultati ottenuti attraverso la spettroscopia micro-Raman, analisi EDS hanno confermato che i cristalli studiati sono costituiti da fosforo, calcio e ossigeno. Il carbonio presente nello spettro appartiene alla materia organica che involupa i cristalli (Figura 80).

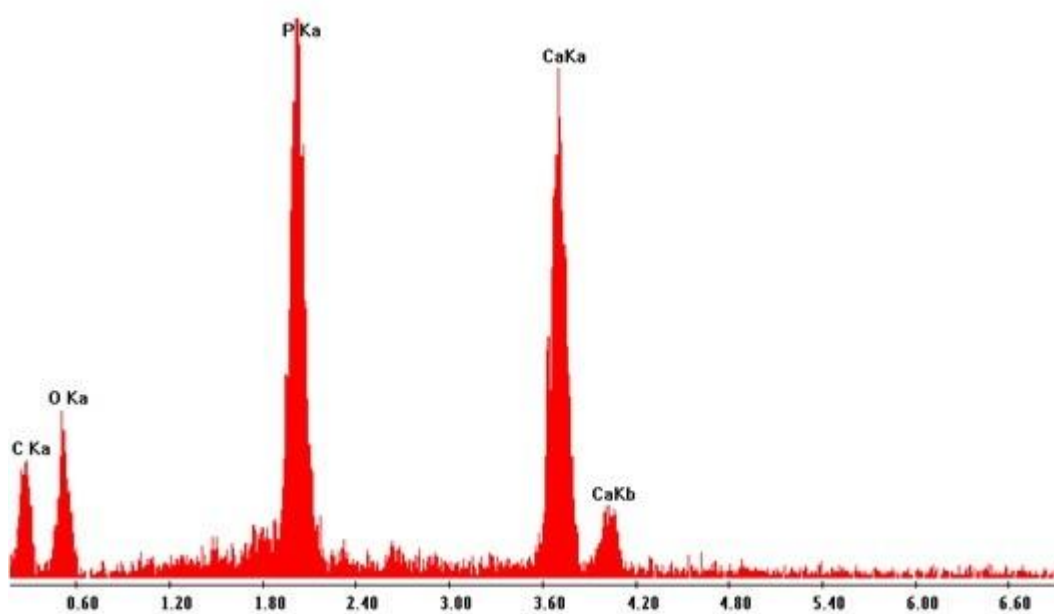
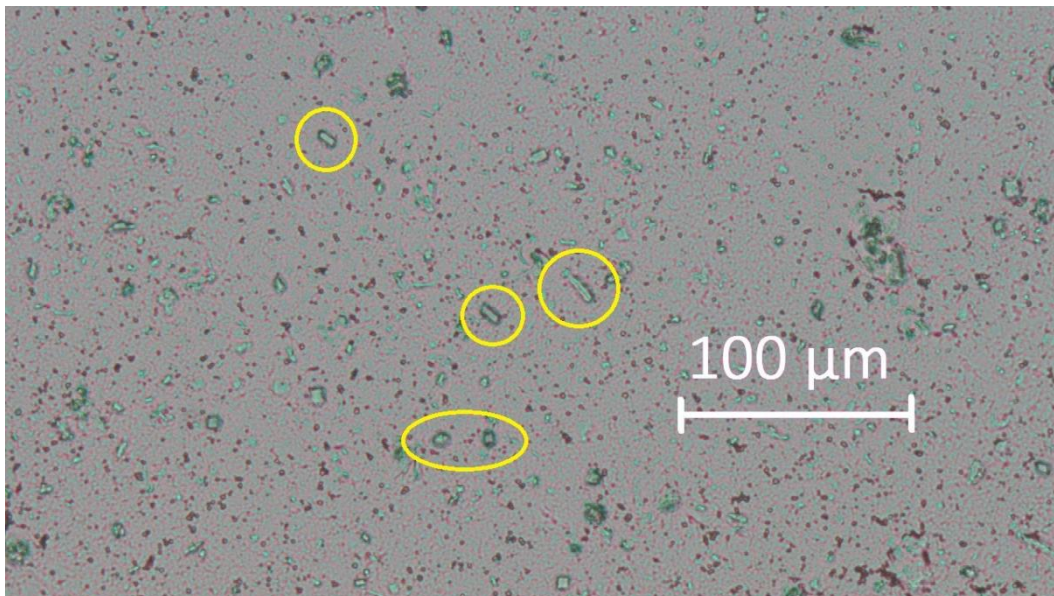


Figura 80: spettro EDS dei cristalli presenti nel campione "3PIZ".

## 5.9 Campione "4CPP"

Il campione "4CPP" rappresenta l'ultimo della serie di campioni trattati con l'enzima ialuronidasi ed anche quest'ultimo, come gli altri tre campioni precedenti, non ha mostrato differenze malgrado il diverso trattamento a cui è stato sottoposto. Al microscopio ottico polarizzatore il campione "4CPP" appare moderatamente ricco in cristalli e più povero di fibrina rispetto agli altri campioni. In [Figura 81](#) è possibile osservare alcuni cristalli a nicols paralleli caratterizzati da abito prismatico più o meno allungato, i quali appaiono birifrangenti positivi a nicols incrociati e con il compensatore inserito ([Figura 82](#)).



**Figura 81:** immagine al microscopio ottico polarizzatore a nicols paralleli del campione "4CPP".

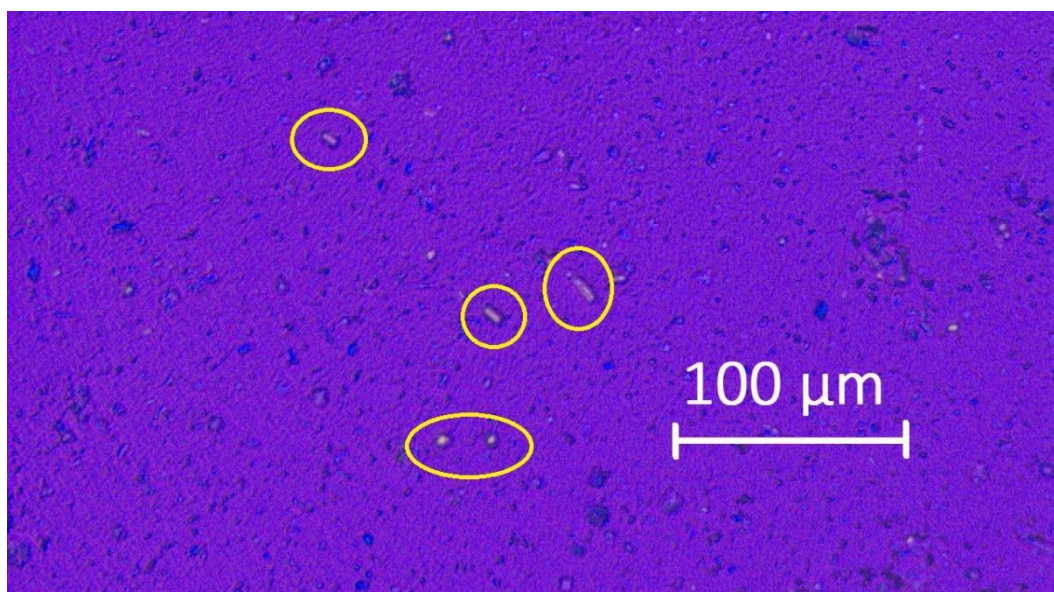


Figura 82: immagine della stessa porzione del campione di Figura 81, al microscopio ottico polarizzatore con il compensatore inserito.

Al fine di ottenere maggiori informazioni relative ai cristalli birifrangenti osservati al microscopio ottico il campione è stato studiato in spettroscopia micro-Raman. Gli spettri ottenuti sono caratterizzati da una serie di picchi assai simili a quelli acquisiti dalle analisi condotte sul campione "3PIZ". In particolare, i picchi principali sono collocati a valori di Raman shift di 1049, 754, 535, 351  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 83), i quali sono caratteristici dello spettro Raman del pirofosfato di calcio diidrato. Inoltre, allo stesso modo degli spettri dei campioni precedenti, si osservano delle bande comprese tra 2800 e 3100  $\text{cm}^{-1}$  ed in altre porzioni dello spettro, caratteristiche della materia organica presente in prossimità dei cristalli.

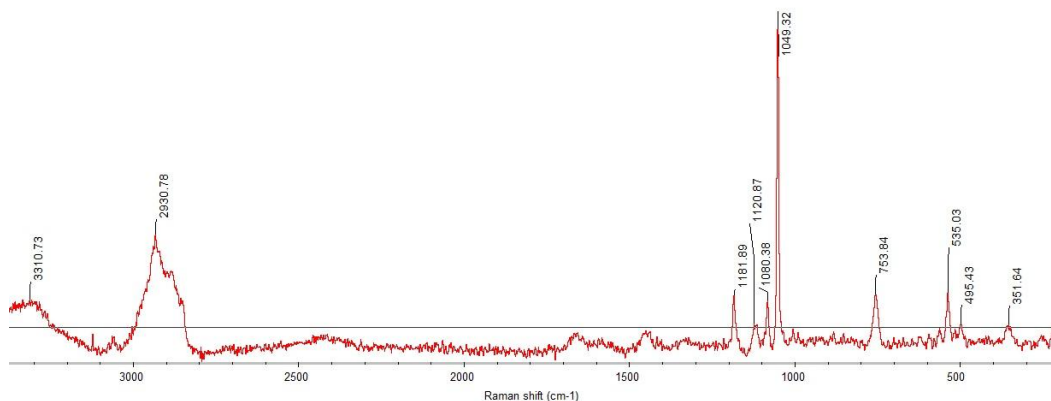


Figura 83: spettro Raman di un cristallo del campione "4CPP".

Attraverso immagini SEM ottenute tramite elettroni retrodiffusi è possibile osservare numerosi cristalli prismatici contraddistinti da una tonalità chiara (Figura 84), caratteristiche già osservate in cristalli di pirofosfato di calcio. Lo spettro acquisito attraverso la tecnica EDS ha confermato che i cristalli osservati sono costituiti da fosforo, calcio e ossigeno (Figura 85). Il picco relativo al carbonio nello spettro EDS appartiene alla materia organica presente in prossimità dei cristalli.

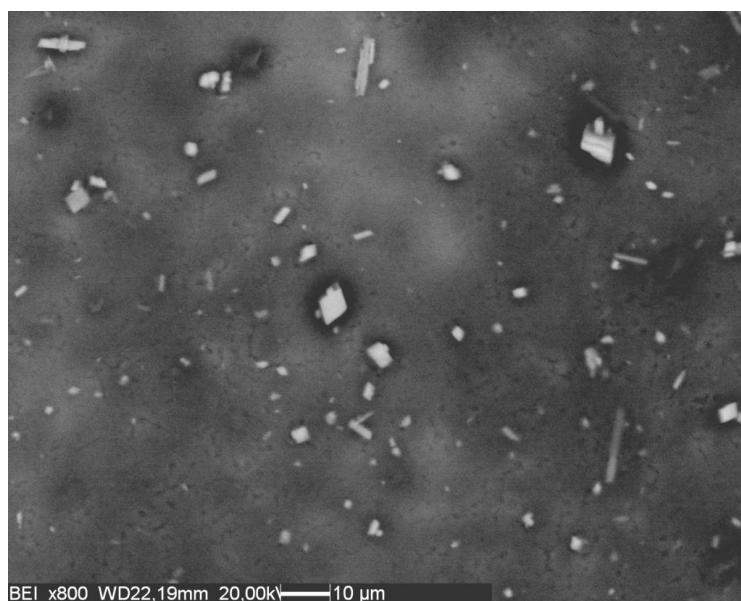


Figura 84: immagine SEM del campione "4CPP" ottenuta in BSE a 800 ingrandimenti.

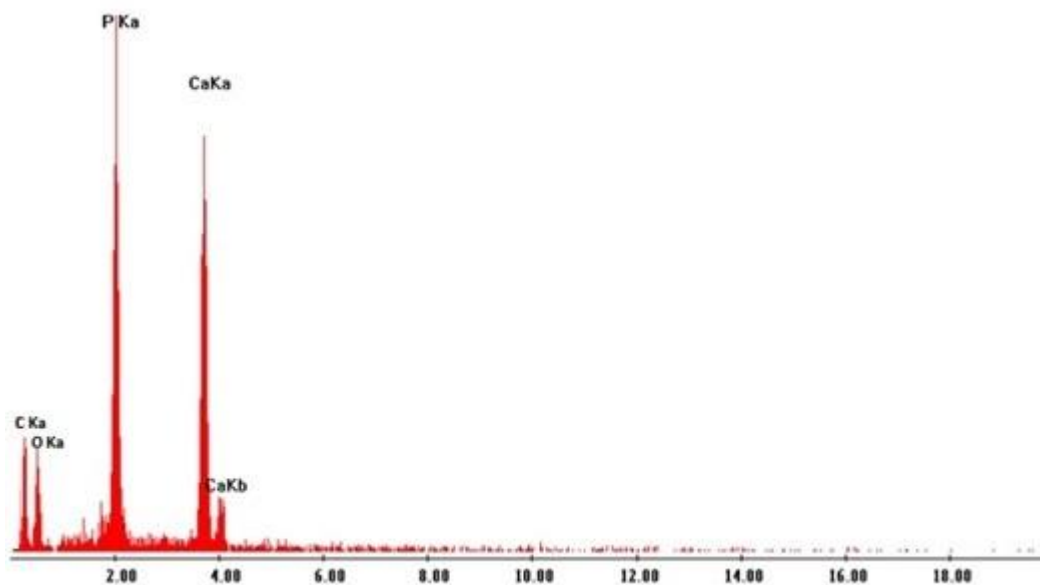


Figura 85: spettro EDS dei cristalli presenti nel campione "4CPP".

### 5.10 Campione "P1"

Il campione P1, a differenza di tutti gli altri liquidi esaminati, proviene dalla porzione dell'avampiede anziché dall'articolazione del ginocchio.

Al microscopio ottico a luce polarizzata con il compensatore inserito è possibile osservare una serie di cristalli aciculari, frequentemente raggruppati in tofi, fortemente birfrangenti e di segno negativo, assai numerosi ma di dimensioni ridotte, sebbene siano presenti anche cristalli che raggiungono una lunghezza di 40µm (Figura 86 e Figura 87). Noto che il liquido proviene dall'avampiede e in base alle caratteristiche ottiche osservate, è verosimile che i cristalli presenti in questo campione siano di urato monosodico.

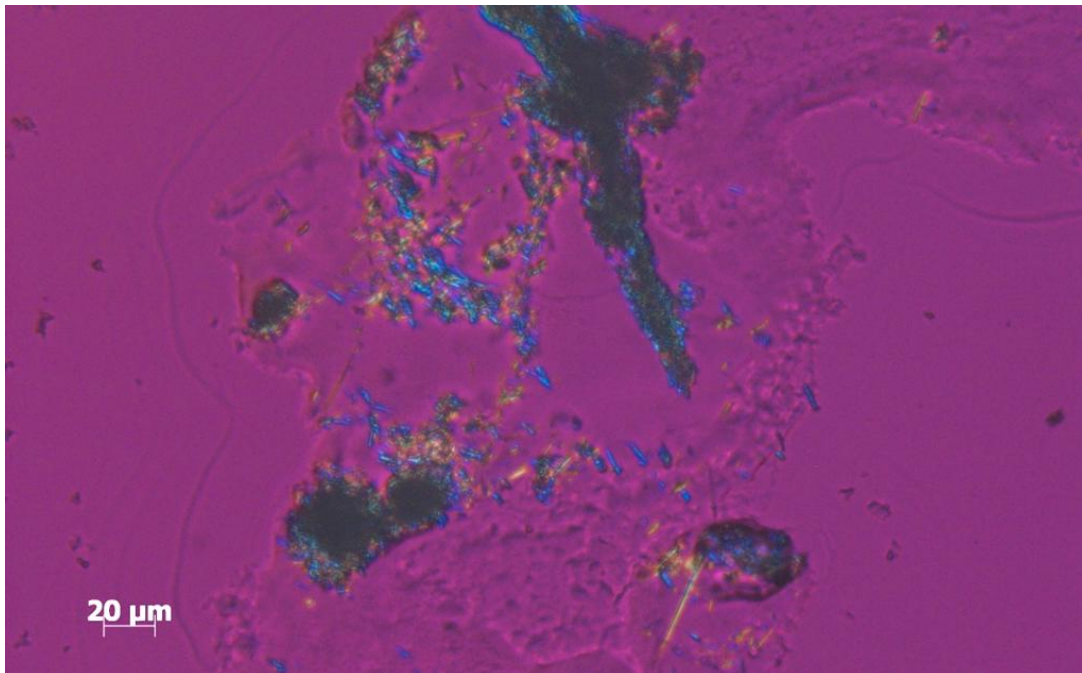


Figura 86: insieme di cristalli che presentano birifrangenza negativa (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).

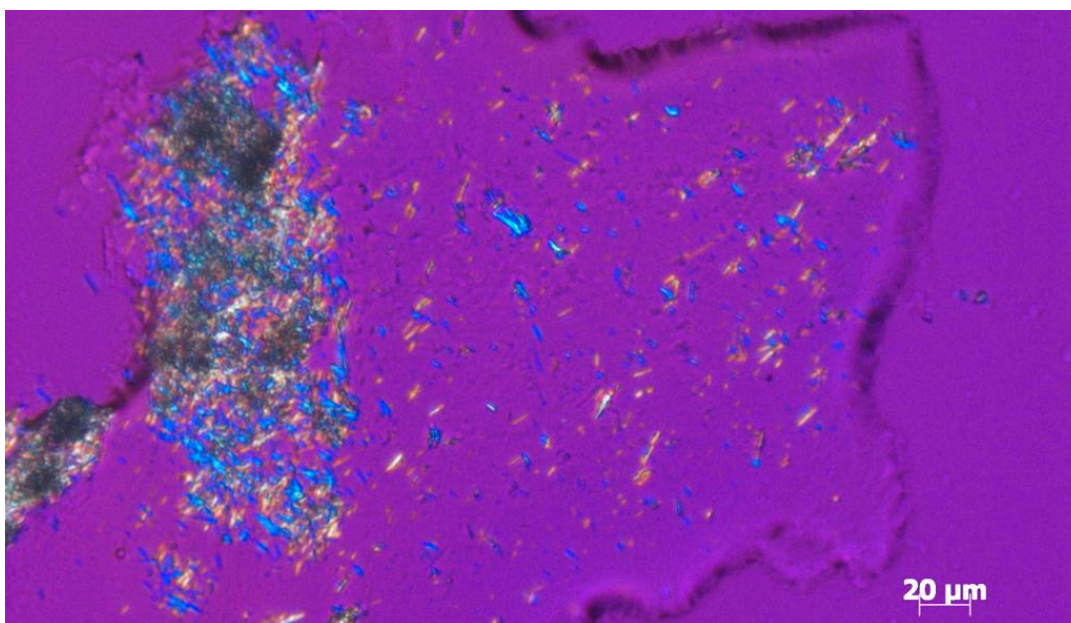
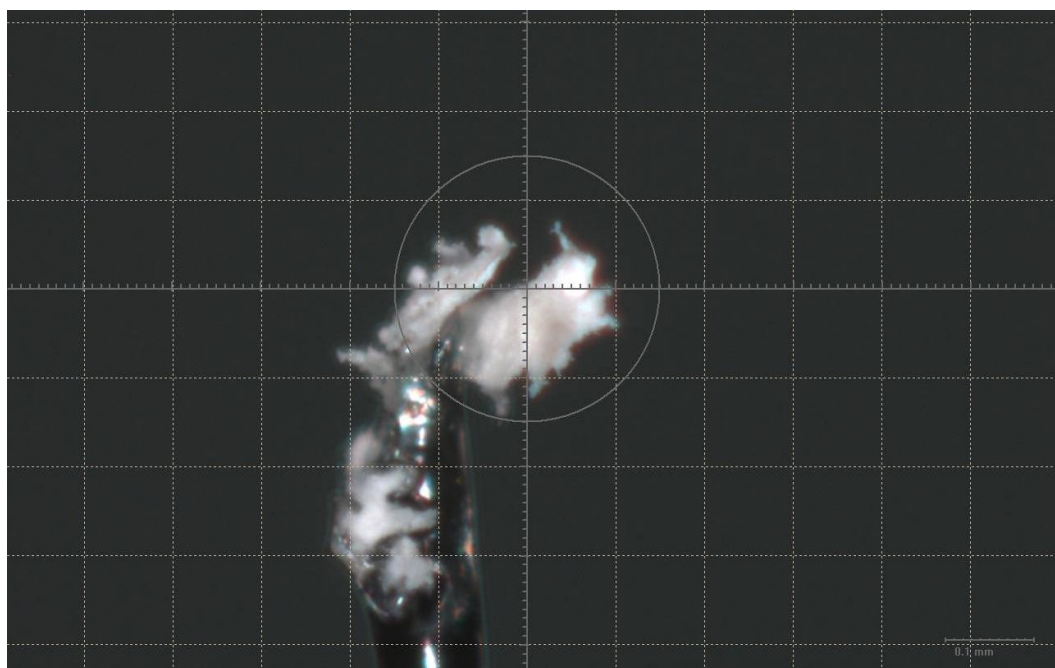


Figura 87: insieme di cristalli che presentano birifrangenza negativa (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).



Per mezzo di una fibra di vetro con diametro di 100  $\mu\text{m}$  è stato prelevato un piccolo agglomerato di cristalli (Figura 88) su cui è stata condotta una misura in micro-diffrazione a raggi X. Il diffrattogramma risultante, riportato in Figura 89, è costituito da diversi picchi di diffrazione, analizzati attraverso l'ausilio del software HighScore Plus. La maggior parte dei picchi ottenuti è risultata appartenere all'urato sodico idrato ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_4\text{NaO}_4$ ), presente nel database PDF con codice di riferimento 031-1890.

Tuttavia, alcuni dei picchi acquisiti non risultano appartenere alla fase cristallina individuata e, nonostante diversi tentativi di assegnazione, non si è ancora giunti all'identificazione di ulteriori fasi contenute nel campione.



**Figura 88:** porzione del campione "P1" analizzato in micro-diffrazione a RX. Il lato della griglia è 100 $\mu\text{m}$ , l'area circolare rappresenta approssimativamente l'area irradiata dal fascio di RX.

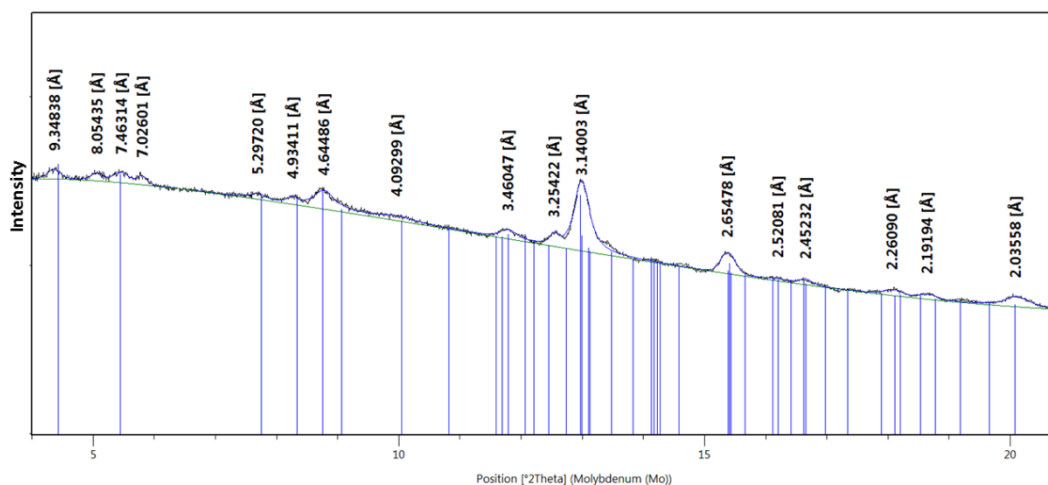


Figura 89: diffrattogramma ottenuto attraverso la micro-diffrazione a RX di un agglomerato cristallino del campione "P1".

Attraverso successive analisi condotte in spettroscopia micro-Raman sono stati acquisiti degli spettri costituiti da numerose bande i cui picchi principali sono posizionati a valori di Raman shift di 619, 1052, 1001, 579  $\text{cm}^{-1}$ . Dal confronto dello spettro raccolto dal campione analizzato con gli spettri dell'urato monosodico rinvenuti in letteratura (*Bolan L. et al., 2014* e *McMahon G., 2009*) è stata osservata la perfetta sovrapposizione di questi (Figura 90).

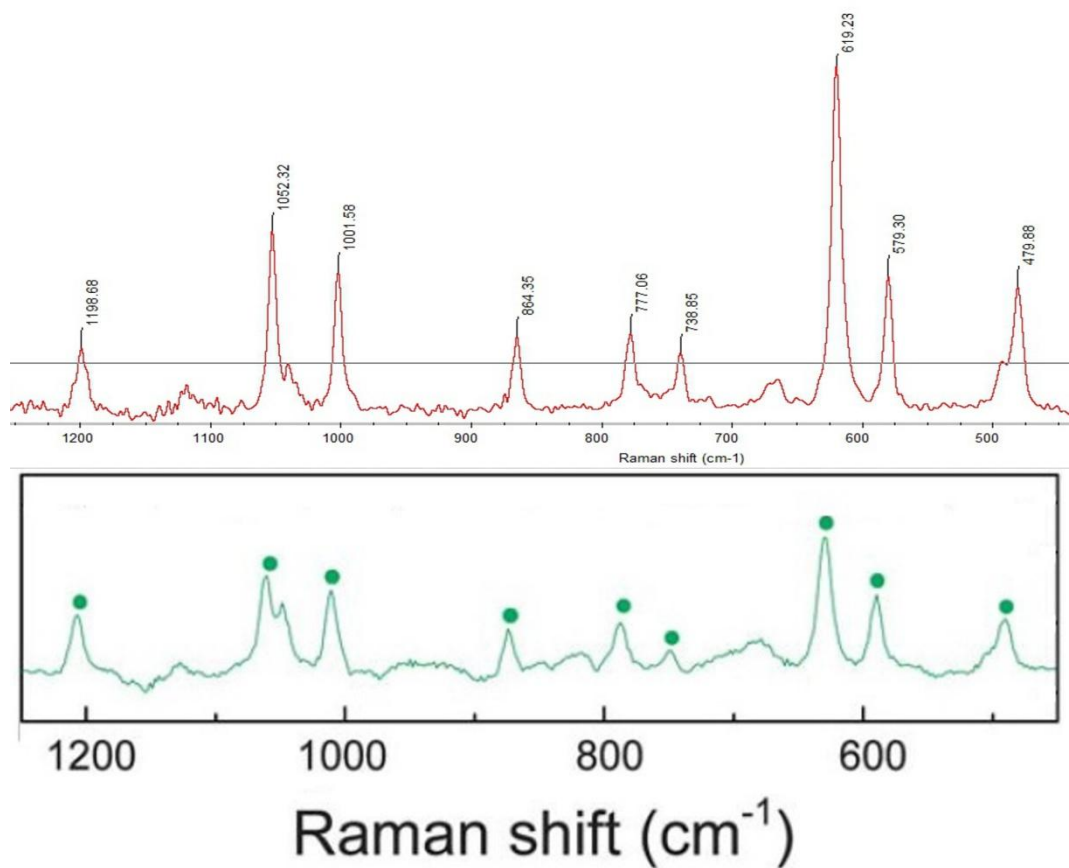


Figura 90: spettro Raman del campione in studio (in alto) e spettro Raman dell'urato monosodico da articolazioni umane documentato in letteratura (Bolan L. et al., 2014) (in basso).

Per verificare la natura dei cristalli anche sulle base attraverso l'acquisizione del loro chimismo sono inoltre state eseguite analisi al SEM. Immagini acquisite da elettroni retrodiffusi dimostrano come i tofi che al microscopio ottico sono risultati completamente opachi in realtà siano costituiti in gran parte da cristalli (Figura 91).

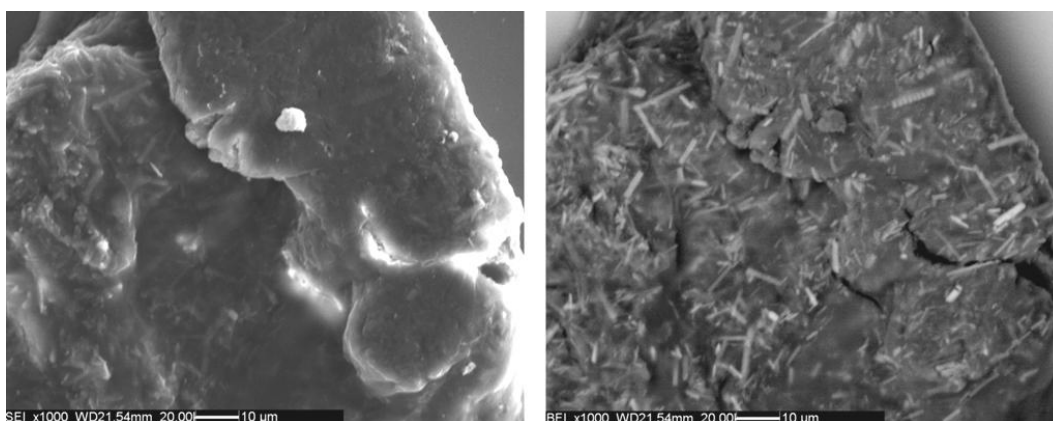


Figura 91: : immagine SEM di un tofo del campione "P1", a sinistra ottenuta in SE e a destra in BSE, entrambe a 1000 ingrandimenti.

Le analisi chimiche EDS eseguite sul materiale appena descritto hanno rivelato la presenza di sodio, ma anche di fosforo e calcio (Figura 92), probabilmente per la compresenza di cristalli di fosfato di calcio con quelli di urato monosodico all'interno dei tofi.

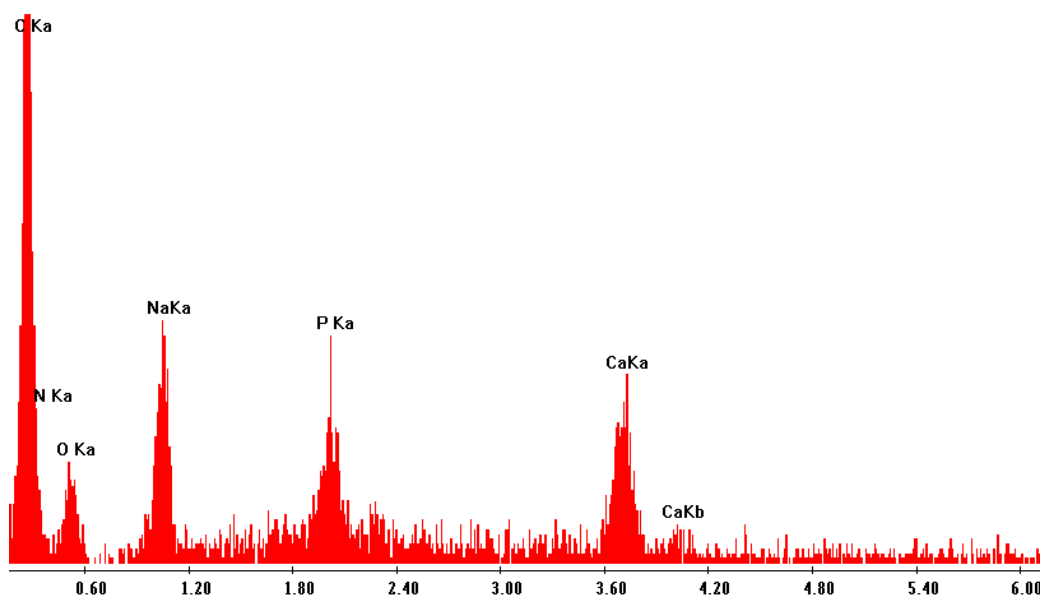
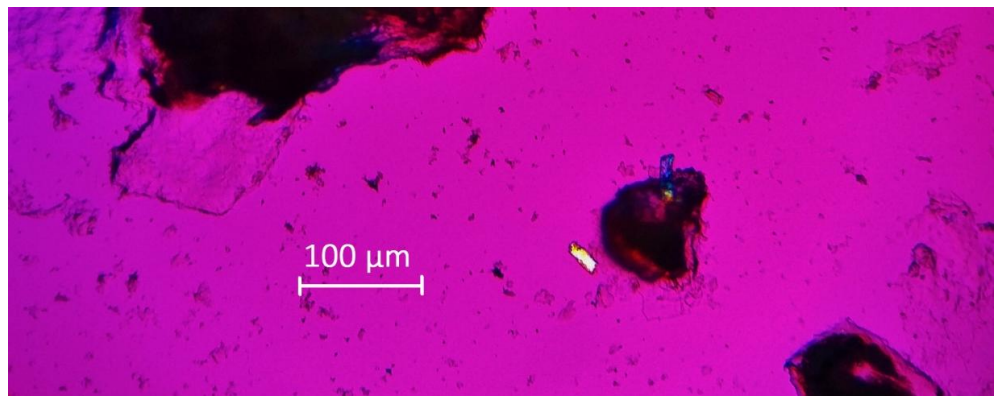


Figura 92: spettro EDS raccolto all'interno di un tofo del campione "P1".

### 5.11 Campioni “OA59PELLET” e “BD”

I campioni “OA59PELLET” e “BD” sono stati i primi, in ordine cronologico, trattati e studiati. Durante una prima osservazione al microscopio ottico in luce polarizzata tali campioni sono risultati assai poveri di cristalli birfrangenti. Nel campione “OA59PELLET” le uniche particelle birfrangenti assimilabili per morfologia a dei cristalli sono osservabili in [Figura 93](#) e [Figura 94](#), le altre particelle birfrangenti presenti nel campione sono classificabili come fibre, polvere o altri corpi non cristallini.



**Figura 93: corpi birfrangenti nel campione “OA59PELLET” (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).**



**Figura 94: corpuscolo birfrangente nel campione “OA59PELLET” (immagine al microscopio ottico in luce polarizzata con compensatore).**

È stato eseguito un tentativo di analisi del cristallo osservabile in [Figura 94](#) attraverso l'utilizzo della micro-diffrazione a RX da cristallo singolo, ma in seguito ad una misura preliminare non sono risultati spot di diffrazione.

Il campione "BD" è risultato completamente privo di cristalli birifrangenti e si è ipotizzato questa caratteristica fosse causata dall'utilizzo dell'etanolo come diluente. Tuttavia, non è stata riscontrata la presenza di cristalli birifrangenti nemmeno dall'osservazione al microscopio ottico polarizzante di una goccia di LS non diluito.

Non avendo individuato cristalli birifrangenti, questi due campioni non sono stati analizzati ulteriormente attraverso l'utilizzo di altre metodologie analitiche.

## 6. Conclusioni

L'approccio multi-metodologico adottato nel presente lavoro di tesi ha consentito di affrontare uno studio approfondito dei cristalli presenti in liquidi sinoviali patologici, utilizzando diverse procedure e metodologie analitiche solitamente impiegate in ambito mineralogico e cristallografico.

Questo lavoro rappresenta un possibile strumento di analisi innovativo ed approfondito finalizzato a fornire un quadro più completo sulla natura delle fasi cristalline coinvolte nell'evoluzione delle diverse patologie reumatiche. Essendo questo da considerarsi uno strumento di ricerca, non va tuttavia inteso come sostituzione, ma piuttosto come integrazione, alla pratica ambulatoriale che rimane fondamentale nella primissima fase di studio del liquido sinoviale.

I liquidi sinoviali analizzati in questo studio rappresentano una casistica volutamente non pianificata di campioni per i quali l'analisi ambulatoriale aveva fornito unicamente l'indicazione di positività a cristalli. In questo modo le numerose problematiche emerse di volta in volta sono state affrontate senza preconcetti.

Le analisi strumentali sono state precedute da una fase preparatoria dei campioni ritenuta particolarmente delicata e importante. Infatti, non esistendo precisi protocolli da seguire, si è dedicata particolare attenzione a questa fase anche con l'obiettivo di individuare delle linee guida utili a predisporre il campione alle analisi in maniera semplice, ma corretta, rendendo riproducibile il percorso di preparazione anche per liquidi da esaminare in futuro.

Sulla base di quanto eseguito si è potuto stabilire che:

- i tempi e i cicli di centrifuga adottati hanno consentito di concentrare i cristalli sul fondo della provetta in maniera adeguata;
- l'utilizzo di etanolo come diluente si è dimostrato non idoneo in quanto provoca la flocculazione e in alcuni casi la dissoluzione di particelle; al contrario, l'uso di acqua ultrapura Millipore® non sembra aver determinato sostanziali variazioni nei preparati;

- l'enzima ialuronidasi, aggiunto allo scopo di ridurre l'effetto della sostanza organica, non ha dato esito evidente, per lo meno nelle proporzioni da noi utilizzate;
- nella scelta dei supporti, tra i diversi materiali testati prima e durante le varie fasi analitiche, non si è giunti ad individuare un unico materiale che non causasse interferenze durante le analisi; tuttavia l'idrato di cellulosa si è dimostrato un supporto particolarmente valido per lo studio dei campioni al microscopio ottico ed elettronico in quanto non risulta polarizzato e la sua composizione non compromette le osservazioni in backscattering e le analisi EDS; inoltre, generando un rumore di fondo non significativo, risulta idoneo anche per le analisi diffrattometriche; per quanto riguarda la spettroscopia Raman, pur producendo un segnale apprezzabile, lo spettro risulta ben definito e riconoscibile.

L'analisi multi-strumentale eseguita quindi sui numerosi preparati ha permesso di individuare e mettere in evidenza le diverse caratteristiche del particolato solido così separato. Questi concentrati sono risultati composti nella maggior parte dei casi da particelle più o meno abbondanti e di varia natura, spesso con caratteristiche note e facilmente riconoscibili, ma che non di rado hanno esibito aspetti inusuali sia nelle forme che nella composizione, tali da rendere il quadro a volte piuttosto intricato.

In particolare, facendo anche riferimento a quanto schematicamente riassunto nella Tabella di pagina 107, in quasi tutti i campioni, come prevedibile, sono stati osservati e riconosciuti cristalli di fosfato di calcio. La natura di questi cristalli, inizialmente individuati al microscopio ottico, è stata successivamente determinata attraverso le analisi SEM-EDS e micro-Raman, confermando così la validità di queste tecniche nell'analisi di cristalli anche di piccolissime dimensioni, spesso inferiori a 10 $\mu$ m. Da uno di questi campioni (7.4.15) è stato inoltre possibile concentrare un quantitativo sufficiente di materiale per poter ottenere



risultati significativi in diffrazione RX da polveri; su una minima frazione dello stesso preparato, è stato inoltre eseguito un ulteriore test di micro-diffrazione dal cui risultato è stato possibile calcolare i parametri di cella corrispondenti al pirofosfato di calcio diidrato; l'esito congruente di tutte queste analisi ha fornito una prima verifica positiva sulla possibilità di ottenere informazioni di notevole rilevanza da cristalli mai analizzati prima mediante un micro-diffrattometro a cristallo singolo.

In uno dei campioni apparentemente privo di fosfati di calcio, ma ricco di cristalli identificati al microscopio ottico come urato monosodico, la presenza di questi ultimi è stata confermata mediante micro-Raman e micro-diffrazione, nonché al SEM dove però la presenza di fosforo e calcio, rivelata dall'analisi EDS, ha suggerito la coesistenza di cristalli di fosfato di calcio rimasti altrimenti invisibili alle altre tecniche analitiche.

In alcuni dei campioni si sono verificate situazioni anomale e inaspettate, spesso fuorvianti, come nel caso di particelle che per la loro morfologia regolare e la birifrangenza sono state inizialmente identificate al microscopio ottico come cristalli di fosfato di calcio, ma in seguito alle analisi EDS e Raman si è appurato trattarsi di nitrato di sodio (BUS, PFCD); in altri casi (GAL, GIB), altre particelle con analoghe caratteristiche (ma di composizione diversa, verosimilmente un composto organico) hanno fornito uno spettro Raman univoco, ma rimasto ancora da assegnare. Ad ogni modo, pare verosimile che tali sostanze possano essere collegate all'assunzione di farmaci o conseguenza di infiltrazioni intrarticolari.

Infine, in due campioni (GIB, PFCD) sono stati identificati (mediante EDS e Raman) cristalli di calcite, relativamente abbondanti, presenti in varie forme e dimensioni. Se è vero che la presenza di ossalato di calcio, componente principale dei calcoli renali, è stata già rilevata anche nei liquidi sinoviali, la calcite (raramente documentata in calcoli renali e urinari) non sembra essere mai stata identificata finora nei liquidi sinoviali.

Considerata la complessità di un contesto, come quello dell'organismo umano e, nello specifico, del liquido sinoviale, in cui le variabili in gioco si sono dimostrate numerose e di varia natura, i risultati ottenuti in questo lavoro e le considerazioni esposte finora, portano a concludere che un approccio multi-metodologico è senza dubbio indispensabile per affrontare uno studio di questo genere.

Tutti gli apparati strumentali utilizzati si sono dimostrati efficaci e complementari nel fornire le informazioni utili a caratterizzare al meglio le sostanze analizzate, e tra questi rimane certamente da esplorare più a fondo la potenzialità della micro-diffrazione a cristallo singolo espressa positivamente nei primi test effettuati.

Alcuni quesiti aperti nel corso di questo studio costituiscono argomento interessante e degno di essere ulteriormente approfondito nel prossimo futuro assieme alla controparte medica alla quale il modello rappresentato da questo lavoro di tesi potrà garantire una migliore comprensione dei fenomeni che regolano la formazione dei cristalli nel liquido sinoviale.

## 7. Appendice

Campioni	Trattamento				Analisi				Supporto			Contenuto				
	n° centr. X/min	H <sub>2</sub> O	Etanolo	l'alur.	OM	Raman	SEM-EDS	micro-XRPD	Vetro	Cellulosa	Zero bkg	CPPD	MSU	Ca carb.	NaNO <sub>3</sub>	"Cristalli organici"
OA 59 PELLET	4X5		X	NO	X			X	X							
p1	4X5		X	NO	X	X	X	X	X		(X)	X				
BD	4X5	X	X	NO	X			X								
GAL	6X10	X		NO	X	X	X	X	X		X					X
BUS	6X10	X		NO	X	X	X	X							X	
GIB	6X10	X		NO	X	X	X	X					X			X
PFCO	6X10	X		NO	X	X	X	X			X		X	X		
7.4.15	4X5	X		NO	X	X	X		X		X		X			
IMN	4X5	X		Si/NO	X	X	X	X			X		X			
2PAM	4X5	X		Si/NO	X	X	X	X			X		X			
3PIZ	4X5	X		Si/NO	X	X	X	X			X		X			
4CPP	4X5	X		Si/NO	X	X	X	X			X		X			

## 8. Referenze

- Bolan L., Shan Y., Ozan A. (2014), A customized Raman system for point-of-care detection of arthropathic crystals in the synovial fluid. *Analyst*, 139, 823-830.
- Buckwalter, J., Lotz, M., Stoltz, J.-F. (2007), Aging, inflammation and altered chondrocyte differentiation in articular cartilage calcification and osteoarthritis. *Osteoarthritis, inflammation and degradation: a continuum. Biomedical and Health Research*, 70, 31-32.
- Chen K., Li M., Cheng W., Balic-Zunic T., Lin S. (2008), Identification of monoclinic calcium pyrophosphate dihydrate and hydroxyapatite in human sclera using Raman microspectroscopy. *International Journal of Experimental Pathology*, 90, 74–78.
- Cheng X., Haggins D. G., York R. H., Yeni Y. N., Akkus O. (2009), Analysis of crystals leading to joint arthropathies by Raman spectroscopy: comparison with compensated polarized imaging. *Applied spectroscopy*, 63(4), 381-386.
- Frallonardo P. (2014), Ruolo dei cristalli di calcio nell’infiammazione. Studio del liquido sinoviale mediante Microscopia Elettronica a Scansione, in pazienti con artrosi del ginocchio. Tesi di Dottorato, Università degli Studi di Padova.
- Gibilisco P., Schumaker H. J., Hollander J., Soper K. (1985), Synovial fluid crystals in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 28(5), 511-515.
- Goldring M. B., Goldring S. R. (2007), Osteoarthritis. *The Journal of Cellular Physiology*, 213(3), 626-634.
- Grassi W., Okano T., Filippucci E. (2015), Use of ultrasound for diagnosis and monitoring of outcomes in crystal arthropathies. *Current Opinion in Rheumatology*, 27(2), 147-155.

- Jaovisidha K., Rosenthal A. K. (2002), Calcium crystals in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 14(3), 298-302.
- Landis R. C., Haskard D. O. (2001), Pathogenesis of crystal-induced inflammation. *Current Rheumatology Reports*, 3(1), 36-41.
- Mandel N. S. (1975), The crystal structure of calcium pyrophosphate dihydrate. *Acta Crystallographica*, B31, 1730-1734.
- McMahon G. (2009), Dublin City University Bioanalytical and Diagnostics Group. *Bioanalysis*, 1(2), 279-283.
- Miksaneck J., Rosenthal A. K. (2015), Imaging of calcium pyrophosphate deposition disease. *Current Rheumatology Reports*, 17(3), 20.
- Nakamoto K. (2006), Planar four-atom molecules. *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds*, tab. 2.4b, 183.
- Nalbant S., Martinez J. A. M., Kitumnuaypong T., Clayburnet G., Sieck M. (2003), Synovial fluid features and their relations to osteoarthritis severity. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11(1), 50-54.
- Oliviero F., Pascual E., Punzi L. (2005), Detection and identification of crystals in synovial fluid. *Reumatismo*, 57(3), 208-211.
- Oliviero F., Scanu A., Galozzi P., Gava A., Frallonardo P., Ramonda R., Punzi L. (2012), Prevalence of calcium pyrophosphate urate crystals in synovial fluid of patients with previously diagnosed joint disease. *Joint Bone Spine*, 80(3), 287-290.
- Pascual E., Jovani V. (2005), Synovial fluid analysis. *Clinical rheumatology*, 19(3), 371-386.
- Punzi L. et al. (2010), *Manuale di Analisi del Liquido Sinoviale*, Pavia, EDMES.

- Punzi L., Cimmino M.A., Frizziero L. et al. (2007), Raccomandazioni della Società Italiana di Reumatologia per l'esecuzione dell'artrocentesi. *Reumatismo*, 59, 227-234.
- Rosenthal A. K., Mandel N. (2001), Identification of crystals in synovial fluids and joint tissues. *Current Rheumatology Reports*, 3(1), 11-16.
- Rousseau D. L., Miller R. E., Leroi G. E. (1968), Raman spectrum of crystalline sodium nitrate. *The Journal of Chemical Physics*, 48, 3409.
- Swan A., Chapman B., Heap P., Seward H., Dieppe P. (1994), Submicroscopic crystals in osteoarthritic synovial fluids. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 53(7), 467–470.
- Yang S. & Akkus O. (2013), Fluorescence background problem in Raman spectroscopy: is 1064nm excitation an improvement of 785nm? Wasatch Photonics, Internal Report, ([http://wasatchphotonics.com/wp-content/uploads/2013/12/FL-Time-1064-nm-vs-785-nm-Shan-9\\_30.pdf](http://wasatchphotonics.com/wp-content/uploads/2013/12/FL-Time-1064-nm-vs-785-nm-Shan-9_30.pdf)).
- Yavorsky A., Hernandez-Santana A., McCarthy G., McMahon G. (2008), Detection of calcium phosphate crystals in the joint fluid of patients with osteoarthritis – analytical approaches and challenges. *Analyst*, 133(3), 302-18.
- Zeller J. L., Lymn C., Glass R. M. (2007), Septic Arthritis. *The Journal of the American Medical Association*, 297(13), 1510.

**Siti Web:**

<http://www.remf.dartmouth.edu>

<http://www.emlyceum.com>

<http://www.thin-section-preparation.com>

<http://www.nd.edu>

<http://www.masterstones.eu>

<http://www.pubs.usgs.gov>

<http://www.servicios.fis.puc.cl>





## 9. Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione di questo lavoro, che mi hanno sostenuto e aiutato.

Ringrazio il mio relatore, Prof. Fabrizio Nestola, per avermi fatto conoscere le mille sfaccettature che la Geologia racchiude, per avermi guidato e motivato durante tutti i passi del presente lavoro di tesi.

Ringrazio il Dott. Luca Peruzzo per avermi affiancato con competenza, professionalità e simpatia in questo lungo e complesso percorso.

Ringrazio il Prof. Leonardo Punzi, le Dott.sse Francesca Oliviero, Anna Scanu e in particolare la Dott.ssa Paola Frallonardo.

Ringrazio la Dott.ssa Maria Chiara Dalconi per la sua cortese disponibilità e i preziosi suggerimenti.

Un sentito ringraziamento a Leonardo Tauro per l'attenzione che mi ha riservato e per il suo aiuto indispensabile.

Un profondo e affettuoso grazie ai miei genitori, sostegno immancabile, che hanno sempre dimostrato interesse in quello che stavo realizzando.

Un ringraziamento particolare va al mio ragazzo Lorenzo che ha sempre creduto in me e nelle mie potenzialità e che mi è stato accanto in tutti i momenti.

Infine, ringrazio i miei amici: Giorgia, Elisa, Jacopo, Maria, Marta, Francesca, Nicola, Marco, Stefano, Samuele, Alessandra che mi hanno dato energia e buon umore.