

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

QUANTIFICAZIONE VIA ICP-MS E ANALISI CHEMIOMETRICA
DEGLI ELEMENTI CONTENUTI IN PLACENTE DI DONNE AFFETTE
DA DIABETE MELLITO GESTAZIONALE

Relatore: Dott. DI MARCO VALERIO
Controrelatore: Dott. NODARI LUCA

LAUREANDA: BERTE' CHIARA

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

Indice

1.	Introduzione.....	1
1.1.	Il diabete mellito	1
1.1.1.	Definizione e frequenza nella popolazione.....	1
1.1.2.	Substrati energetici e metabolismo glucidico.....	2
1.1.3.	L'insulina	2
1.1.4.	Classificazione del diabete mellito.....	3
1.1.5.	Prevenzione e trattamento del diabete.....	7
1.1.6.	Le complicanze acute e croniche	8
1.2.	Scopo della tesi	11
1.3.	Il diabete mellito gestazionale	12
1.3.1.	Definizione e frequenza nella popolazione.....	12
1.3.2.	La gravidanza normale e complicata dal diabete mellito gestazionale	12
1.3.3.	Fattori di rischio del diabete gestazionale	16
1.3.4.	Complicanze nella madre e nel feto	17
1.3.5.	Diagnosi e screening	18
1.3.6.	La terapia del diabete gestazionale	21
1.3.7.	Marker elementari nel diabete mellito gestazionale e nelle altre forme di diabete mellito	21
1.4.	La placenta umana	23
1.4.1.	Morfologia.....	23
1.4.2.	Modalità di trasporto placentare.....	25
1.4.3.	Funzioni.....	26
1.4.4.	Circolazione sanguigna nella placenta	28
1.4.5.	Secondamento	29
1.4.6.	La placenta diabetica	30
1.4.7.	Composizione elementare della placenta.....	30
1.4.8.	Biochimica di alcuni elementi rilevanti nella placenta.....	31
1.5.	Strumentazione ICP-MS	39
1.5.1.	Introduzione e vantaggi della tecnica	39
1.5.2.	Introduzione del campione	39
1.5.3.	La sorgente a plasma	40
1.5.4.	Interfaccia plasma-spettrometro di massa	40

1.5.5.	La cella di collisione	41
1.5.6.	L'analizzatore di massa.....	41
1.5.7.	Il rivelatore	42
1.5.8.	Interferenze spettroscopiche	42
1.5.9.	Analisi quantitativa con l'ICP-MS.....	44
1.6.	La digestione umida con riscaldamento a microonde	44
1.7.	L'analisi elementare	45
1.8.	Gli strumenti statistici	45
1.8.1.	Calcolo del Limite di Rivelabilità e Quantificazione.....	45
1.8.2.	Test statistici.....	46
1.8.3.	Confronto di dati appaiati (dipendenti)	46
1.8.4.	Test di Wilcoxon Mann Whitney della somma dei ranghi.....	47
1.8.5.	F-test.....	48
1.8.6.	t-test di Student.....	48
1.8.7.	Analisi delle componenti principali (PCA)	49
2.	Parte sperimentale	51
2.1.	Reagenti.....	51
2.2.	Campionamento.....	52
2.3.	Preparazione dei campioni.....	52
2.4.	Digestione microonde	53
2.5.	Procedura di calibrazione	54
2.6.	Parametri operativi dell'ICP-MS.....	55
2.7.	L'analisi elementare	55
2.8.	Le calibrazioni.....	55
2.9.	Metodo di analisi.....	58
2.10.	Prova di recupero	59
2.11.	Analisi dei campioni di placenta.....	61
2.11.1.	Presenza degli elementi e concentrazioni.....	61
2.11.2.	Risultati dei test statistici	63
2.11.3.	Analisi delle componenti principali	66
2.12.	Analisi dei campioni di sangue	71
2.12.1.	Presenza degli elementi e concentrazioni.....	72
2.12.2.	Risultati dei test statistici	73
2.12.3.	Analisi delle componenti principali	74

3.	Discussione.....	77
3.1.	Metodo di analisi	77
3.2.	Analisi dei campioni di placenta	78
3.3.	Analisi dei campioni di sangue.....	81
4.	Conclusioni.....	83
5.	Bibliografia	85

1. Introduzione

1.1. Il diabete mellito

1.1.1. *Definizione e frequenza nella popolazione*

Negli ultimi anni le malattie del metabolismo hanno assunto una rilevanza via via crescente fino a costituire uno dei capitoli più importanti della medicina moderna. Tale rilevanza è giustificata dai rilievi epidemiologici che segnalano come ormai nel mondo occidentale la principale causa di morte oggi sia rappresentata dalla patologia aterosclerotica¹ alla cui base vi sono di solito anche delle anomalie metaboliche. Fra queste spicca per importanza e diffusione la malattia diabetica, che interessa circa il 5-6% della popolazione mondiale [1].

Il diabete mellito è una patologia metabolica complessa ed eterogenea, caratterizzata da un aumento della concentrazione ematica di glucosio (*iperglicemia*). Tale condizione si realizza a seguito di una carenza assoluta (*diabete tipo 1*) o relativa (*diabete tipo 2*) di insulina, ormone che rappresenta il principale regolatore del metabolismo degli zuccheri, consentendone l'ingresso nelle cellule per fornire loro energia necessaria a svolgere tutte le reazioni metaboliche.

L'alterazione del metabolismo degli zuccheri si accompagna in genere all'alterazione di altre vie metaboliche (lipidi, proteine) e a modificazioni responsabili di alterazioni funzionali e strutturali di molti organi.

Se non precocemente diagnosticato e curato, il diabete può accompagnarsi allo sviluppo di complicanze acute, che costituiscono un pericolo immediato per la vita, e di complicanze croniche. Proprio queste ultime sono le responsabili della compromissione della qualità della vita e degli elevati costi socio-sanitari legati alla malattia [2].

Ciò che distingue il diabete da altre malattie croniche è la necessità di una continua e costante autogestione da parte dei pazienti e delle loro famiglie. Il diabete influenza e modifica le abitudini alimentari, richiede un'attività fisica adeguata, controlli periodici e una gestione continua del trattamento. Tutto questo comporta una modifica dello stile di vita, del rapporto con il cibo, tradizioni, norme e credenze sulla salute.

¹ Patologia aterosclerotica: patologia dovuta alla degenerazione delle pareti arteriose causata dal deposito di placche formate da grasso e tessuto cicatriziale. Tali arterie perdono elasticità, resistenza, risultano più suscettibili alla rottura e presentano un lume interno inferiore, ostacolando il flusso sanguigno.

1.1.2. Substrati energetici e metabolismo glucidico

Il corpo umano è costituito da substrati (glucidi, proteine, lipidi, oltre ad oligoelementi ed acqua) in grado di garantire la sopravvivenza dell'organismo.

Dal punto di vista delle fonti energetiche, i lipidi costituiscono la quota di deposito di energia spendibile più importante, mentre i glucidi rappresentano una componente quantitativamente inferiore. Tuttavia questi ultimi svolgono alcune funzioni peculiari: sono substrati preferenziali per alcuni distretti o tessuti, tra cui il sistema nervoso centrale, e in molte condizioni (digiuno breve, esercizio fisico breve e di limitata intensità) rappresentano i substrati energetici più utilizzati.

I singoli substrati non rappresentano entità statiche poiché sono sottoposti a meccanismi di regolazione che ne controllano le concentrazioni e il ricambio; tali meccanismi sono garantiti da complesse interazioni che comprendono sia gli effetti metabolici degli ormoni che quelli tra i substrati stessi.

Insulina e glucagone, ormoni prodotti dal pancreas, sono i principali regolatori della concentrazione ematica del glucosio sul quale hanno un effetto opposto. L'insulina ne inibisce la produzione da parte del fegato aumentando il suo utilizzo a livello periferico e favorisce quindi l'abbassamento dei livelli glicemici nell'organismo in condizioni di iperglicemia; il glucagone esercita un effetto contrario.

1.1.3. L'insulina

Nel 1889, per merito di Von Mering e Minnkowski, fu stabilita la relazione tra pancreas e regolazione del metabolismo glucidico. Si osservò infatti come la rimozione del pancreas fosse seguita dall'innalzamento della glicemia e da una sindrome diabetica. Nel 1921, Banting e Best estrassero dal tessuto pancreatico canino un principio dotato di azione ipoglicemizzante. Questa sostanza venne denominata insulina e successivamente cristallizzata da Abel. L'insulina è stata la prima proteina la cui sequenza amminoacidica sia stata completamente determinata [3]. Questa molecola è composta da due catene polipeptidiche, catena A e catena B, di 21 e 30 amminoacidi, tra di loro connesse da due ponti disolfuro. Un terzo legame disolfuro è presente sulla catena A. La sequenza comprende 51 amminoacidi ed il peso molecolare è 5.800. Le differenze interspecie sono modeste soprattutto per le insuline d'interesse clinico. L'integrità della molecola insulinica è necessaria per la sua azione biologica e la regione compresa tra i residui amminoacidici 22-26 della catena B sembra essere di vitale importanza nei processi di legame recettoriale e nell'esplicazione dell'attività biologica.

Come già anticipato, l'insulina viene sintetizzata nel pancreas, organo costituito da centinaia di migliaia di cellule ormono-secerenti, note come *isole di Langherans*. In queste sono presenti le cellule A o alfa che producono glucagone e le cellule B o beta che producono insulina.

Dopo essere stata sintetizzata e secreta, l'insulina circola nel sangue e raggiunge gli organi bersaglio (soprattutto fegato, muscoli e tessuto adiposo) dove esercita la sua azione a seguito del legame con uno specifico recettore posto sulla membrana cellulare, in grado di riconoscerla e legarla selettivamente. Tale recettore presenta una struttura glicoproteica ed è costituito da due subunità (alfa e beta).

L'azione insulinica consiste nel mantenere adeguati i livelli di glicemia sia nella fase di digiuno che durante e dopo i pasti. Nel periodo di digiuno, sia notturno che a distanza dai pasti, esiste una minima secrezione ormonale che mantiene livelli bassi ma costanti di insulina in circolo. Questi livelli basali di insulina sono importanti perché, in assenza di glucidi di origine alimentare, consentono al fegato di produrre una giusta quantità di glucosio. In concomitanza con i pasti invece la secrezione di insulina, che è fortemente sensibile all'aumento della glicemia dovuto all'apporto alimentare di glucidi, si incrementa in maniera rapida. Questo bolo di insulina è necessario per una completa utilizzazione degli zuccheri di origine alimentare (soprattutto da parte del fegato e dei muscoli) e quindi per mantenere entro i valori normali la glicemia post prandiale.

La carenza assoluta o relativa di insulina nel diabete comporta che il fegato produca glucosio in eccesso (*iperglicemia a digiuno*) ed inoltre impedisce che il glucosio di origine alimentare sia completamente utilizzato (*iperglicemia postprandiale*).

Oltre al metabolismo glucidico l'insulina regola anche quello lipidico e amminoacidico. Tale ormone stimola infatti l'utilizzo di amminoacidi a livello epatico e muscolare, ne riduce l'ossidazione e riduce il catabolismo proteico. Inoltre, sempre a livello epatico, stimola la sintesi de novo di acidi grassi a partire da precursori glucidici.

1.1.4. Classificazione del diabete mellito

L'espansione delle conoscenze scientifiche ha portato, nel 1997, alla definizione della classificazione della malattia diabetica attualmente in uso, su proposta degli esperti dell'*American Diabetes Association (ADA)* e la successiva approvazione dell'*Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO)*.

Questa classificazione tiene conto, insieme alle categorie di diabete mellito propriamente detto (diagnosticato a seguito di livelli glicemici a digiuno maggiori a 126 mg/dL confermati, oppure valori di glicemia random maggiori di 200 mg/dL, oppure presenza di glicosuria, oppure valori di HbA1c² maggiori o uguali a 6.5%) anche di alcune alterazioni del metabolismo glucidico che costituiscono delle condizioni di rischio per lo sviluppo della malattia diabetica. Si distinguono:

- *diabete mellito tipo 1 (DMT1)*
- *diabete mellito tipo 2 (DMT2)*
- *altri tipi specifici di diabete*
- *diabete mellito gestazionale (GDM)*
- *ridotta tolleranza ai carboidrati (IGT) e alterata glicemia a digiuno (IFT)*

Il *diabete tipo 1 (DMT1)* è la forma nota, nel recente passato, anche come *diabete insulino-dipendente (IDDM)*, termine con il quale si sottolineava il fatto che i soggetti con tale forma di diabete necessitavano per tutta la loro vita di un trattamento insulinico, in quanto il loro pancreas non era più in grado di produrre tale ormone. Altre definizioni, con le quali si cercava di rilevare sue peculiari caratteristiche cliniche, erano *diabete giovanile*, perché forma più frequente nei bambini e nei giovani, e *diabete magro*, perché caratterizzato, almeno all'esordio, da peso corporeo normale, o addirittura ridotto.

Il DMT1 colpisce in genere soggetti in giovane età (< 30 anni) ed è dovuto, in presenza di una predisposizione genetica, ad una reazione autoimmune³ scatenata dal contatto con agenti ambientali quali alcuni virus (parotite, rosolia, herpes simplex, citomegalovirus), da sostanze tossiche o composti come le proteine del latte di mucca (caseina, albumina, beta-lattoglobulina), il glutine, i grassi, nitrati e nitriti, caffè e tè che modificano o attivano alcuni antigeni beta-cellulari rendendoli estranei all'organismo; contro questi antigeni si instaura una risposta immunitaria che provoca la progressiva distruzione delle beta-cellule.

La storia naturale del DMT1 consiste in un periodo iniziale, più o meno lungo, di predisposizione genetica e nella successiva comparsa in circolo, a seguito del contatto con gli eventi ambientali precipitanti, degli autoanticorpi responsabili poi della distruzione beta-cellulare. Compare quindi l'iperglicemia con sintomi abbastanza tipici quali sete marcata (polidipsia), urinazione frequente e abbondante (poliuria), nausea, vomito, astenia

² HbA1c: emoglobina glicata (o glicosilata): è una forma di emoglobina usata per identificare la concentrazione plasmatica media di glucosio.

³ Reazione autoimmune: reazione del sistema immunitario contro componenti del proprio organismo: comporta la produzione di auto-anticorpi, sostanze di natura proteica che svolgono un'azione antagonista verso gli antigeni dell'organismo considerati come estranei.

(mancanza o perdita di forza dell'intero organismo o dei suoi singoli apparati e organi), dolori addominali, dimagrimento nonostante una polifagia. L'intervento terapeutico sostitutivo con insulina porta ad un iniziale recupero della residua funzione pancreatico con un notevole miglioramento della funzione metabolica, normalizzazione, o quasi, dei valori glicemici e possibilità di ridurre o, addirittura, sospendere il trattamento insulinico. Tale miglioramento, del tutto temporaneo, perché dura per alcune settimane o alcuni mesi, è definito *luna di miele (Honey Moon)*.

Il DMT1 fortunatamente non è molto frequente, rappresentando solo circa l'8% di tutte le forme di diabete, per una prevalenza media pertanto dello 0.03-0.05% tra i giovani di età compresa tra 0 e 20 anni. L'età di massima incidenza del DMT1 sono quelle comprese tra i 5 e 7, gli 11 e 13 e i 18 e 20 anni, età in cui in genere i ragazzi entrano in comunità quali la scuola o il servizio di leva, evento che facilita il contatto con alcuni virus.

Il *diabete tipo 2 (DMT2)*, essendo dovuto non a insulino-carenza ma ad una situazione di resistenza periferica all'insulina, è caratterizzato da iperglicemie più modeste, tali da non provocare glicosuria marcata; per tale motivo il suo esordio è in genere casuale, graduale, e di solito asintomatico. Tale forma era nota in un recente passato come *diabete-non-insulino-dipendente (NIDDM)*, perché, almeno nei primi anni, non richiede trattamento con insulina, o come *diabete grasso o della maturità*. Il DMT2, infatti, colpisce, in presenza di una predisposizione genetica, soggetti di età > 50 anni in sovrappeso o obesi. La genetica di tale forma è ancora in gran parte sconosciuta, anche se la familiarità in tali soggetti è molto spesso presente. Il gemello monozigote di un diabetico tipo 2 ha teoricamente il 100% di probabilità di diventare diabetico. I fattori ambientali più importanti, che rappresentano il momento favorente la comparsa del diabete, sono il sovrappeso (circa l'80% dei diabetici tipo 2 sono obesi o in sovrappeso) e la sedentarietà. Altri fattori di rischio di DMT2 sono l'ipertensione arteriosa, appartenenza a particolari razze/etnie (afro-americani, ispano-americani...), precedente alterata glicemia a digiuno o ridotta tolleranza al glucosio, pregressa diagnosi di diabete gestazionale o parto macrosomico⁴, HDL⁵ ≤ 35 mg/dL e/o trigliceridi ≥ 250 mg/dL.

La patogenesi del DMT2 è legata a due difetti; da un lato il deficit della secrezione pancreatico di insulina e dall'altro la resistenza periferica alla sua azione, responsabile, a livello del fegato, della mancata o ridotta soppressione della produzione di glucosio, e, a

⁴ Macrosomia: condizione che si presenta quando il feto alla nascita pesa più di 4500 g

⁵ HDL: acronimo che sta per *High Density Lipoprotein*, proteine responsabili del trasporto del colesterolo (colesterolo HDL, definito anche *colesterolo buono*)

livello muscolare, della sua ridotta utilizzazione. La logica conseguenza di tale deficit è l'aumento dei livelli glicemici sia a digiuno che post prandiali.

In pratica il DMT2 costituisce la punta di un iceberg (iperglicemia a digiuno, Stadio 3), la cui base è rappresentata da una predisposizione genetica con obesità addominale e insulino-resistenza (Stadio 1), cui segue deficit della secrezione di insulina con aumento della produzione epatica di glucosio e iperglicemia postprandiale (Stadio 2).

Essendo spesso asintomatico, la diagnosi del DMT2 è piuttosto tardiva, dai 5 ai 7 anni dopo il suo esordio. Il DMT2 rappresenta la quasi totalità dei quadri iperglicemici con una prevalenza che nelle nazioni occidentali, raggiunge ormai, e spesso supera, il 5-6% della popolazione, con punte del 15-20% nei soggetti con più di 65 anni.

La categoria *altri tipi specifici di diabete mellito* comprende un'ampia varietà di disordini non correlati tra loro, che non possono essere classificati né come diabete mellito tipo 1 né come diabete mellito tipo 2. Queste forme di diabete possono essere dovute a:

- difetti genetici della funzione delle cellule beta
- difetti genetici dell'azione dell'insulina
- patologie del pancreas
- patologie endocrine, in cui vi è un'eccessiva produzione di ormoni che ostacolano l'azione dell'insulina; in genere in questi casi l'iperglicemia si risolve quando viene curata la patologia responsabile dell'eccesso di ormone
- farmaci o sostanze chimiche, che possono alterare l'azione o la secrezione dell'insulina, determinando in alcuni casi la distruzione delle cellule beta del pancreas
- infezioni
- forme non comuni di diabete immunomediato
- altre sindromi genetiche

Il *diabete mellito gestazionale (GDM, Gestational Diabetes Mellitus)*, argomento di questo lavoro di tesi, si riferisce invece a un diabete che esordisce o viene diagnosticato durante la gravidanza, più frequentemente durante il terzo trimestre, e scompare dopo il parto. Se non adeguatamente trattato, esso comporta problemi sia alla madre che al feto. Tale tipo di diabete verrà approfondito maggiormente nel prossimo capitolo.

1.1.5. *Prevenzione e trattamento del diabete*

Misure di prevenzione primaria sono raccomandabili quando siano disponibili interventi in grado di evitare o, quantomeno, ritardare la comparsa della malattia. Nel caso della malattia diabetica ciò è realizzabile per il DMT2, mentre per il DMT1, mancando misure efficaci, la prevenzione primaria non è al momento attuabile. I soggetti da sottoporre alle misure preventive sono gli individui a rischio di DMT2, quelli cioè con familiarità, obesità, “prediabete” (IGT, IFT, pregresso GDM). In accordo ai recenti Standard Italiani per la Cura del Diabete Mellito (2007) tali soggetti dovrebbero osservare alcune raccomandazioni volte soprattutto a modificare il loro stile di vita, riducendo il sovrappeso attraverso attività fisica costante e un'alimentazione moderata.

La cura del diabete ha come obiettivo principale, al fine di una prevenzione secondaria delle varie complicanze d'organo, quello di ottenere la normalizzazione dei parametri sia del controllo glicemico sia degli altri fattori di rischio associati, quali fumo, ipertensione arteriosa e dislipidemia (alterazione della concentrazione dei lipidi nel sangue). Il trattamento, diverso nelle varie forme di diabete, si basa su alcune misure essenziali, incentrate sull'educazione alimentare, sull'aumento dell'attività fisica, sull'utilizzo di insulina e ipoglicemizzanti orali, sul trattamento dei fattori di rischio associati e sull'educazione all'autocontrollo e all'autogestione.

La terapia insulinica è invece la terapia specifica, e unica, del DMT1, definito proprio per tale motivo, nel passato, insulino-dipendente. Senza il ricorso a tale trattamento il destino di tali pazienti è lo scompenso chetoacidotico⁶ con possibile morte.

Proposta inizialmente per il solo trattamento del DMT1, da qualche tempo si utilizza, anche piuttosto precocemente, nel DMT2. Tale necessità deriva dalla convinzione che, nella patogenesi del DMT2, il deficit di insulina gioca un ruolo non secondario, ma almeno pari a quello della resistenza periferica. Infine la terapia insulinica si rende necessaria anche in circostanze “stressanti” (infarto, interventi chirurgici e in alcuni casi nel diabete in gravidanza).

L'insulina è il più potente ed efficace ipoglicemizzante disponibile ma, come tutte le proteine, non può essere assunta per via orale perché verrebbe degradata dagli enzimi digestivi. È necessario quindi somministrarla per via parenterale (ossia per via diversa da quella del tubo digerente), il che rappresenta il principale limite di questa terapia. Un'alternativa è rappresentata dagli ipoglicemizzanti orali che rappresentano la terapia di

⁶ Scompenso chetoacidotico: scompenso metabolico dovuto ad una carenza di insulina; tale carenza comporta una risposta compensatoria dell'organismo che per la produzione di energia sfrutta il metabolismo lipidico con conseguente produzione di corpi chetonici.

scelta nel diabete tipo 2 nel momento in cui l'intervento sullo stile di vita non è stato in grado di far ottenere il controllo glicemico desiderato. Appartengono a questa classe gli *insulino-secretagoghi* (sulfoniluree e glinidi), gli *insulino-sensibilizzanti* (metformina e glitazoni) e gli *inibitori α -glucosidasi* (acarbose e miglitolo).

1.1.6. *Le complicanze acute e croniche*

I quadri complicativi della malattia diabetica si distinguono in acuti e cronici o tardivi. I quadri acuti tipici sono rappresentati dalle *crisi ipoglicemiche*, dalla *chetoacidosi* e dalla *sindrome iperglicemica iperosmolare*. La *lattico-acidosi* è invece una complicazione comune a molte altre condizioni.

L'*ipoglicemia* è frequente nel DMT1 come conseguenza spesso della somministrazione di dosi inadeguate di insulina (in quanto in eccesso rispetto all'effettivo fabbisogno) o a seguito dell'esecuzione di un'attività fisica non prevista e non programmata. Le varie cause d'ipoglicemia nei diabetici trattati con insulina possono essere distinte in situazioni con iperinsulinemia assoluta o relativa. Anche gli ipoglicemizzanti orali del gruppo delle sulfoniluree, in particolare quelli a più lunga durata d'azione, possono essere causa di crisi ipoglicemiche, che nell'anziano possono essere pericolose perché in grado di scatenare eventi cerebrovascolari. La sintomatologia delle crisi ipoglicemiche è abbastanza tipica ed è legata nella prima fase, quando la glicemia scende sotto i 70 mg/dL, alla reazione ormonale adrenergica volta ad aumentare i valori glicemici, e nella seconda fase, quando i valori scendono al di sotto i 50 mg/dL, alla sofferenza delle cellule cerebrali, le più sensibili alla carenza di glucosio. I sintomi della prima fase, detti appunto *adrenergici o neurogenici*, sono la sudorazione, l'ansia, il tremore, l'irritabilità, mentre quelli della seconda fase, detti *neuroglicopenici*, sono il senso di fame, le vertigini, l'offuscamento della vista, le difficoltà a parlare e a concentrarsi. Se la glicemia scende ulteriormente si può arrivare al coma ipoglicemico e anche alla morte.

Le *crisi iperglicemiche* sono rappresentate dalla *chetoacidosi* e dalla *iperosmolarità*. La chetoacidosi è il risultato di un'acidosi indotta da un'elevata concentrazione di corpi chetonici conseguente alla mancanza assoluta o relativa di insulina. Non essendo bloccata la lipolisi, un eccesso di acidi grassi liberi dal tessuto adiposo è avviato al fegato dove è utilizzato per la formazione dei corpi chetonici. È una complicanza classica del DMT1 (insulino-carente) e si verifica in particolare al suo esordio, circostanza in cui il deficit di

insulina è in genere assoluto, in quanto non è stata ancora instaurata una terapia sostitutiva, oppure quando la comparsa di malattie intercorrenti o di fattori “stressanti” (febbre, infarto, terapia con cortisone) aumenta di molto il fabbisogno di insulina. Pur essendo una complicanza acuta, la sua comparsa è in genere annunciata per alcuni giorni da sintomi caratteristici legati all’aumento della glicemia e all’elevata glicosuria: sete intensa, urinazione abbondante e poliuria, nausea e vomito, dolore addominale e disturbi visivi. Senza un’adeguata somministrazione di insulina, il soggetto va incontro allo scompenso acidotico, causa purtroppo ancora oggi di morte.

L'*iperosmolarità*, o *sindrome iperglicemica iperosmolare*, è invece una complicanza peculiare del diabete tipo 2 e, pur avendo sintomi analoghi alla chetoacidosi con più marcata disidratazione, se ne differenzia proprio perché non ha chetosi ed acidosi. Il motivo va ricercato nel fatto che l’insulina presente nel DM2 è sufficiente ad espletare la sua azione di blocco della lipolisi, anche se non è sufficiente ad evitare la cospicua iperglicemia. Le cause di tale iperosmolarità vanno ricercate in eventi concomitanti e “stressanti” che, causando l’immissione in circolo di ormoni “controinsulari”, accentuano di molto la resistenza periferica all’insulina provocando un cospicuo aumento dei valori glicemici e, conseguentemente, all’osmolarità plasmatica. Anche in questo caso l’aumento della glicemia non è improvviso ma graduale ed è responsabile del solito corteo di sintomi. Il trattamento dell’iperosmolarità è simile a quello del coma chetoacidotico.

L'*acidosi lattica* è invece una grave acidosi metabolica dovuta ad un aumento del lattato plasmatico associato ad una riduzione del pH (<7.35). Tale complicanza è caratteristica di tutte le situazioni caratterizzate da ipossia⁷ tissutale, causa di iperproduzione di acido lattico: shock, scompenso di cuore, asfissie, gravi anemie, intossicazioni da monossido di carbonio. I sintomi con cui si presenta tale complicanza sono: polipnea (aumento della frequenza dei movimenti respiratori), tachicardia, astenia, ipotensione arteriosa, nausea, vomito, obnubilamento sino al coma, oltre alla sintomatologia legata alla malattia di base. Fortunatamente tale quadro nel diabetico è molto raro da qualche anno, grazie all’osservanza di precise norme di prevenzione.

Le *complicanze croniche o tardive*, dette così perché in genere si presentano dopo diversi anni la comparsa del diabete, costituiscono oggi il problema più importante della malattia

⁷ Ipossia: condizione patologica causata da una diminuzione di ossigeno.

diabetica poiché causano mortalità precoce, disabilità e peggior qualità della vita. Poiché nel DMT2 la diagnosi viene in genere eseguita alcuni anni dopo il suo esordio (circa 5-7 anni), le complicanze d'organo si possono riscontrare già alla diagnosi e, a volte, costituiscono il motivo che ha spinto alla diagnosi del diabete.

Le complicanze croniche sono prevalentemente di tipo vascolare, interessando sia i piccoli vasi, capillari e arteriole (*microangiopatia*), sia le arterie di calibro più grande, quali le coronarie, le cerebrali e le arterie degli arti inferiori, nel qual caso si parla di *macroangiopatia*. Sono quadri microangiopatici la *retinopatia*, la *nefropatia*, la *neuropatia*, mentre appartengono alla macroangiopatia le *vasculopatie coronarica, cerebrale e periferica*.

La *retinopatia diabetica* consiste in un'affezione microvascolare retinica ad andamento cronico caratterizzata da una molteplicità di lesioni e conseguentemente da quadri clinici molto differenti per evoluzione e prognosi. In genere il controllo ottimale della glicemia e della pressione arteriosa rappresentano ancora oggi le pietre miliari nella prevenzione primaria della retinopatia diabetica.

La *nefropatia diabetica* è un processo patologico a carico del rene, che culmina nell'insorgenza di insufficienza renale con una perdita totale della funzione di questo organo.

La *neuropatia diabetica* consiste in una compromissione neurologica che si manifesta in un soggetto affetto da malattia diabetica conclamata in assenza di altre cause palesi di neuropatia periferica. I sintomi sono inizialmente di tipo sensitivo e poi di tipo motorio: tachicardia fissa, ipotensione posturale, disturbo erettile, paresi dello stomaco (gastroparesi). La compromissione neurologica riveste particolare importanza in quanto, compromettendo seriamente le varie sensibilità (dolorifica, termica...) espone il diabetico ad eventi traumatizzanti, in particolare a livello del piede, con complicanze che spesso possono portare, se non adeguatamente trattate, all'amputazione dell'arto.

Una complicanza molto importante è la *macroangiopatia*, che costituisce oggi la causa più frequente di mortalità, precisamente nel 44% per infarto del miocardio, nel 8% per ictus e nel 5% per morte improvvisa. In realtà la macroangiopatia s'identifica con l'*aterosclerosi (ATS)* che nel diabetico è solo più frequente e più precoce.

I meccanismi aterogeni dell'insulina sono riassunti di seguito:

- aumento della formazione della placca lipidica e riduzione della regressione
- stimolo della sintesi lipidica nel tessuto arterioso
- stimolo della sintesi del tessuto connettivo (collagene)
- stimolo della proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce
- aumento della sintesi del colesterolo e dell'attività dei recettori per le LDL⁸
- stimolo dei fattori di crescita

1.2. Scopo della tesi

Negli ultimi decenni l'attenzione nei confronti del diabete in gravidanza è cresciuta notevolmente come confermato dall'aumento progressivo del numero di articoli pubblicati su questo argomento.

A questo crescente interesse della comunità scientifica è corrisposta una radicale modifica dell'atteggiamento clinico nei confronti della gravidanza complicata dal diabete mellito. Infatti, fino ad alcuni decenni fa la gravidanza nella donna diabetica era sconsigliata, alla luce dei maggiori rischi per la salute in termini di maggiori tassi di morbilità⁹ e mortalità riscontrati nelle donne gravide diabetiche rispetto alle non diabetiche, e di maggiore incidenza di danni embrionali, fetali e neonatali, potenzialmente anche molto gravi.

Al giorno d'oggi, invece, grazie ai grandi progressi nella terapia del diabete e ad una migliore assistenza ostetrica e neonatale, la condizione diabetica è considerata pienamente compatibile con la maternità, sia che si tratti di una forma preesistente al concepimento (il cosiddetto diabete "*pregestazionale*") sia che l'alterazione insorga durante la gravidanza, come nel caso del diabete *gestazionale*. Tuttavia, se il tasso di mortalità materna si è allineato con quello della popolazione non diabetica, non altrettanto si può dire della morbilità materna, dell'abortività precoce, del tasso di malformazioni fetali, della morbilità e mortalità perinatale (ossia dalla 29^a settimana di gestazione al 28° giorno dopo il parto). Per tali parametri si è infatti ancora lontani da una completa normalizzazione degli esiti della gravidanza. Inoltre le donne con diabete gestazionale presentano un rischio nettamente aumentato di sviluppare un diabete mellito di tipo 2 negli anni successivi al parto ed infine, ma non meno importante, un insoddisfacente controllo glicemico materno espone il feto ad un alto rischio di alterazioni metaboliche nell'età adulta.

⁸ LDL: acronimo che sta per *Low Density Lipoprotein*: proteine responsabili del trasporto del colesterolo (colesterolo LDL, definito anche *colesterolo cattivo*).

⁹ Morbilità: termine utilizzato per indicare l'intensità dell'impatto di una malattia sulla popolazione.

Risulta quindi chiara la necessità di conoscenze più approfondite per cercare di far fronte a questa patologia, sia ricalibrando l'intervento assistenziale che terapeutico, con nuove insuline, nuovi protocolli e nuove tecnologie ma anche con farmaci innovativi non insulinici [4].

Questo lavoro di tesi si colloca in un progetto di ricerca volto ad analizzare la composizione di placentate di donne sane e di donne che hanno sviluppato il diabete mellito gestazionale nel corso della gravidanza. Lo scopo è quello di acquisire informazioni riguardo possibili differenze nella composizione placentare dei due gruppi di donne. Il riscontro di un'eventuale differente composizione potrebbe infatti rappresentare un primo passo verso lo sviluppo di nuovi farmaci e quindi nuove terapie per la cura del diabete gestazionale e delle sue complicanze. Nello specifico, il presente lavoro di tesi ha l'obiettivo di ricavare il contenuto dei vari elementi chimici (analisi degli elementi).

1.3. Il diabete mellito gestazionale

1.3.1. *Definizione e frequenza nella popolazione*

Già nel 1882 J. Matthews Duncan osservò che il diabete può presentarsi durante la gravidanza e cessare con la fine di questa. Nel 1950 W. P. U. Jackson riportò una maggiore probabilità di aborto spontaneo prematuro e macrosomia fetale in donne con diabete; nel 1957 Elsie Reed Carrington coniò il termine "*diabete gestazionale*" [5].

Il GDM definito come "*intolleranza ai carboidrati di gravità variabile a insorgenza o primo riscontro in corso di gravidanza*" [6], è oggi tra le più frequenti complicanze della gestazione (rappresenta circa il 90% di tutte le gravidanze complicate dal diabete), interessando una percentuale variabile tra l'1 e 14% di tutte le gravidanze a seconda della popolazione o gruppo etnico considerati e dei metodi e indici di riferimento che possono differire da un Paese all'altro [7].

1.3.2. *La gravidanza normale e complicata dal diabete mellito gestazionale*

La gravidanza è caratterizzata da un complesso rimaneggiamento endocrino-metabolico finalizzato a garantire il necessario apporto di nutrienti al feto e preparare in maniera adeguata l'organismo materno al parto e alla lattazione. Le principali modifiche metaboliche riguardano la riduzione della sensibilità insulinica, un aumento della risposta

beta-cellulare, un modesto aumento delle glicemie, soprattutto quelle postprandiali, e un'alterazione dei livelli circolanti di acidi grassi liberi, dei trigliceridi, del colesterolo e dei fosfolipidi.

Metabolismo glucidico - La condizione di insulino resistenza che si instaura con il progredire della gravidanza, più evidente a livello del tessuto muscolare e adiposo, è una condizione fisiologica finalizzata alla crescita fetale. Il minor utilizzo del glucosio insulino-mediato da parte dell'organismo materno determina infatti un maggiore utilizzo dei substrati lipidici a fini energetici, e contemporaneamente garantisce al feto un maggiore apporto di carboidrati.

L'insulino resistenza fa quindi della gravidanza una condizione naturalmente diabetogena, che si trasforma in GDM solo in concomitanza di altri fattori predisponenti, di natura genetica e/o ambientale.

Tale condizione di insulino resistenza deriva sia dall'aumento dell'adiposità materna che dalla minore sensibilità all'insulina a causa degli ormoni prodotti dalla placenta: la *somatomammotropina corionica umana (HCS, formalmente chiamato ormone lattogeno placentare umano)*, il *cortisolo libero e legato*, gli *estrogeni e progesterone*, sono tutti ormoni che agiscono sul recettore insulinico e sul trasporto e metabolismo del glucosio. Tutte queste influenze sono più marcate nel diabete gestazionale.

L'insulino resistenza compare soprattutto nella seconda metà della gestazione e aumenta progressivamente fino al momento del parto quando, in molti casi, scompare.

Il rapido abbattimento dell'insulino resistenza dopo il parto suggerisce un maggiore contributo da parte degli ormoni placentari rispetto all'effetto dovuto all'aumento di adiposità materna.

Con il procedere della gravidanza l'aumento della resistenza dei tessuti all'insulina determina una crescente domanda di questo ormone. Come già anticipato, infatti, alla gravidanza è associato un aumento della risposta beta-cellulare, che, a fronte della condizione di insulino resistenza, garantisce una maggior produzione di insulina. Anche questi cambiamenti avvengono in parallelo con lo sviluppo dell'unità feto-placentare e la produzione locale di ormoni da parte della placenta.

Nella maggior parte delle gravidanze l'equilibrio tra insulino resistenza e rifornimento della stessa da parte del pancreas materno è mantenuto, ma se la resistenza insulinica diventa predominante la donna diventa iperglicemica.

Come già sottolineato, nel diabete mellito gestazionale la condizione di insulino resistenza, il livello di glicemia postprandiale e la risposta beta-cellulare sono più marcati rispetto alla gravidanza normale a causa di una maggiore influenza da parte degli ormoni prodotti dalla placenta (Tabella 1); quindi il feto risulta esposto a livelli di glicemia superiori rispetto alla norma [8].

Tabella 1: Effetti della gravidanza sul metabolismo del glucosio e dell'insulina (confronto tra gravidanza normale e gravidanza complicata dal diabete gestazionale)

Glicemia	↓ nello stato di digiuno ↑ in condizioni post prandiali	
Secrezione insulinica		
- A digiuno	↑ Gravidanza normale	↑ Diabete Gestazionale
- Dopo carico glucidico		
1 ^a fase	↑↑ Gravidanza normale	↑ Diabete Gestazionale
2 ^a fase	↑ Gravidanza normale	↑ Diabete Gestazionale
Insulino-resistenza	↑ Gravidanza normale	↑↑ Diabete Gestazionale
Organo bersaglio	Tessuto muscolare	

A tal proposito, Jorgen Pedersen nel 1954, in Danimarca, fu il primo a proporre un meccanismo mediante il quale i substrati materni potessero esercitare un effetto diretto sul feto. Nel tentativo di spiegare i “neonati di grandi dimensioni” che si possono osservare nelle gravidanze complicate dal diabete, egli avanzò l’ipotesi dell’*“iperglicemia-iperinsulinismo”* cioè che, quando l’insulina materna è insufficiente, una maggiore quantità di zucchero raggiunge il feto attraverso la placenta e questo glucosio “extra” stimola un maggior rilascio di insulina da parte del pancreas fetale la quale è responsabile dell’aumento della massa fetale. L’ipotesi di Pedersen ha incontrato un sempre maggiore consenso in seguito alla dimostrazione che la placenta è impermeabile all’insulina, cosicché l’insulina materna e quella fetale (e gli effetti metabolici di queste insuline) risultano separate. Lavori successivi hanno dimostrato che tutti i substrati materni possono essere alterati anche nelle forme più lievi di diabete gestazionale e che ciò può far aumentare i nutrienti disponibili per la crescita fetale (Figura 1) [9].

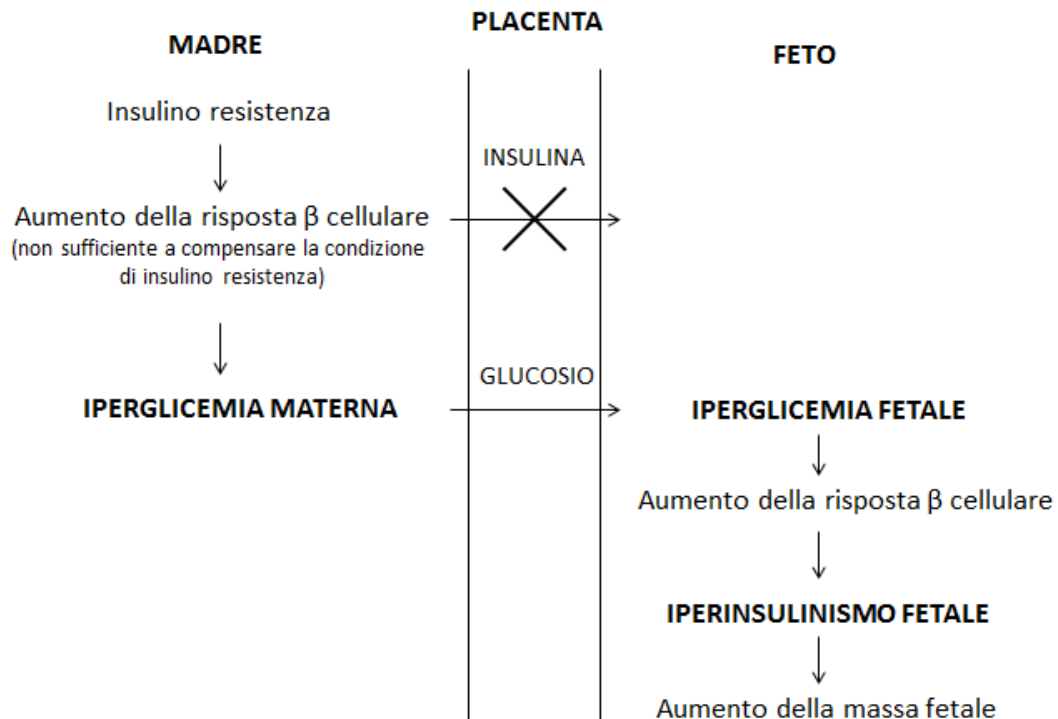


Figura 1: Rappresentazione schematica della condizione di iperglicemia-iperinsulinismo ipotizzata per la prima volta da Pedersen nella gravidanza diabetica

Si osserva quindi che i meccanismi patogenetici del diabete gestazionale possono ritenersi sovrapponibili a quelli del diabete di tipo 2; secondo alcuni autori infatti il diabete mellito gestazionale potrebbe rappresentare una fase precoce del diabete di tipo 2, in quanto queste due sindromi presentano gli stessi fattori di rischio e la stessa suscettibilità genetica [10].

Infatti per una determinata popolazione o gruppo etnico il rischio di diabete gestazionale rispecchia la frequenza di diabete di tipo 2 [11].

Metabolismo lipidico - Le modifiche metaboliche a livello del fegato e del tessuto adiposo determinano variazioni delle concentrazioni di trigliceridi, acidi grassi, colesterolo e fosfolipidi: ad una loro iniziale riduzione nelle prime otto settimane segue un aumento. Queste alterazioni sono dovute a due meccanismi specifici: l'aumentata sintesi epatica delle lipoproteine VLDL¹⁰ ricche in trigliceridi e la ridotta rimozione delle stesse, riconducibili rispettivamente all'effetto degli estrogeni esercitato sul fegato e alla bassa attività della

¹⁰ Lipoproteine VLDL: lipoproteine a densità molto bassa (*Very low Density Lipoprotein*) che legano trigliceridi, principalmente, e colesterolo esterificato a livello del fegato, dove sono prodotte.

lipoprotein-lipasi¹¹ e della lipasi epatica dovuta all'insulino resistenza. La presenza di GDM induce uno stato di dislipidemia coerente con lo stato di insulino resistenza; le donne con GDM presentano elevate concentrazioni di trigliceridi e valori più bassi di colesterolo HDL rispetto alle gravide normali. Gli acidi grassi, derivati dai trigliceridi, attraversando la placenta possono contribuire alla macrosomia [8].

Metabolismo proteico - Le alterazioni a carico del metabolismo proteico si manifestano in gravidanza con una diminuzione degli aminoacidi circolanti, sia nella condizione a digiuno che nello stato postprandiale. L'ipoaminoacidemia a digiuno è provocata dall'aumentata neoglucogenesi epatica¹², mentre l'ipoaminoacidemia postprandiale sembra conseguire ad un'accelerata utilizzazione materna e fetale, nonché ad alterazioni del volume di distribuzione. Il minor utilizzo di carboidrati a scopo energetico li rende disponibili per la sintesi tissutale materna, giustificata dalle modificazioni che intervengono a livello dei vari organi (utero, mammella, tessuto adiposo, fluidi extracellulari, ecc...) e trasferiti al feto per le sue esigenze strutturali e nutritive [8].

1.3.3. *Fattori di rischio del diabete gestazionale*

Sono stati condotti diversi studi per identificare i fattori di rischio per l'insorgenza di GDM; tra i più importanti ricordiamo l'eccessiva adiposità (indice di massa corporea (IMC¹³) pregravidico $\geq 25 \text{ kg/m}^2$) una macrosomia fetale pregressa ($\geq 4500 \text{ g}$), l'età materna avanzata (≥ 35 anni), la presenza di parenti di primo grado con diabete di tipo 2 e diabete gestazionale in una gravidanza precedente. Tra questi l'eccessiva adiposità materna è quello che influisce maggiormente. Inoltre ci potrebbe essere una modesta influenza anche da parte del fumo (prima e/o durante la gravidanza).

Altro fattore d'incidenza è il Paese di provenienza; infatti rispetto alle donne di origine caucasica, le donne asiatiche, spagnole e americane native presentano un rischio maggiore di sviluppare questa patologia. Secondo alcune ricerche anche la bassa statura della madre potrebbe rappresentare un rischio. D'altra parte è stato dimostrato che l'attività fisica prima e durante la gravidanza e una sana alimentazione sono invece fattori in grado di ridurre il rischio di sviluppare il diabete mellito gestazionale [12].

¹¹ Lipasi: classe di enzimi la cui funzione consiste nell'idrolizzare i trigliceridi, trasformandoli in glicerolo e acidi grassi

¹² Neoglucogenesi epatica: processo metabolico mediante il quale, in caso di necessità dovuta ad una carenza di glucosio nel flusso ematico, un composto non glucidico (in questo caso amminoacidi) viene convertito in glucosio nel fegato.

¹³ IMC: Indice calcolato dividendo il peso (kg) per l'altezza al quadrato (m^2)

1.3.4. *Complicanze nella madre e nel feto*

L'importanza della prevenzione e della cura del diabete mellito gestazionale, come già anticipato nella parte introduttiva, si percepisce dalle numerose complicanze cui è soggetta sia la madre che il feto/neonato.

Se apparentemente il GDM può sembrare una semplice e transitoria alterazione del metabolismo glucidico in gravidanza, esso nasconde in realtà elevati rischi per la salute, non solamente limitati al periodo della gestazione.

Pazienti con diabete gestazionale presentano un rischio maggiore di raggiungere un peso eccessivo durante la gravidanza e di soffrire di preeclampsia¹⁴, chetoacidosi e polidramnio (eccesso di liquido amniotico) [13].

Le donne affette da GDM, a causa dell'aumento della quantità di glucosio nelle urine (glicosuria), la cui concentrazione è comunque elevata anche durante una gravidanza normale, sono soggette a maggiori infezioni del tratto urinario [14].

Inoltre diverse evidenze sottolineano come vi sia un rapporto tra pregresso GDM e futuro sviluppo di diabete mellito, ma anche tra pregresso GDM e aumentato rischio di insorgenza di patologie cardiovascolari a carico della madre [15].

Il parto nella donna diabetica può presentare diversi problemi ostetrici. Può avvenire per le vie naturali nei casi in cui non ci sia sproporzione materno/fetale, la parità non sia elevata, il collo uterino sia adeguatamente appianato e dilatato. In tutti gli altri casi, che sono la maggioranza, vi è accordo nel ritenere preferibile il parto cesareo, in genere programmato e indotto farmacologicamente, a partire dalla fine dell'ottavo mese [16].

Per quanto riguarda il neonato, numerose sono ormai le evidenze che dimostrano come l'aumento della glicemia materna comporti un aumentato rischio di morbidità del feto e del neonato e ciò è probabilmente la conseguenza dell'iperinsulinemia fetale indotta da un eccesso di glucosio materno. Come già riportato, il passaggio transplacentare di glucosio determina infatti iperglicemia fetale, iperinsulinemia compensatoria con conseguente eccessivo sviluppo dei tessuti insulino-sensibili (tessuto adiposo, muscolare scheletrico e miocardico, epatico, isolotti di Langherans), crescita fetale accelerata e quindi macrosomia e, dopo resezione del cordone ombelicale, ipoglicemia neonatale [8]. Quest'ultima può causare al bambino attacchi epilettici, danni al cervello e coma. La macrosomia fetale

¹⁴ Preeclampsia: disturbo che causa un malfunzionamento precipitoso del sistema neurologico, renale e cardiovascolare della madre e che può avere come conseguenze l'ischemia placentare e il distacco parziale o totale della placenta.

aumenta il rischio di sproporzione feto-pelvica e quindi di distocie, che sono traumatiche sia per il feto che per la partoriente, traumi da parto, asfissia neonatale. La macrosomia può verificarsi anche se la glicemia materna è rimasta pressoché normale durante la gravidanza, a causa di una aumentata utilizzazione fetale di acidi grassi liberi e di glicerolo derivanti dalla accelerata mobilizzazione materna, caratteristica del diabete.

La maturità polmonare è carente nel feto di madre diabetica e ciò comporta un maggiore rischio di distress respiratorio¹⁵ nel neonato e quindi di ipossia neonatale e di conseguenti handicaps.

Squilibri elettrolitici (ipocalcemia e ipomagnesemia) ricorrono frequentemente nei nati da madre diabetica ma non se ne conoscono le cause.

La policitemia è di riscontro frequente e comporta un aumento della viscosità del sangue, che ha quindi difficoltà a scorrere nei vasi di piccolo calibro; questo ostacolo alla microcircolazione produce una ipossia tissutale. Conseguenza della policitemia è la iperbilirubinemia¹⁶.

Inoltre i bambini nati da madri con GDM presentano una maggiore probabilità di essere obesi e sviluppare a loro volta il diabete mellito di tipo 2 [17].

L'entità dei rischi fatali-neonatali è proporzionale alla severità dell'iperglicemia materna [13].

1.3.5. Diagnosi e screening

I criteri adottati per lo screening e la diagnosi del diabete mellito gestazionale non sono univoci ed i più noti sono stati stabiliti sulla base del rischio di sviluppare diabete dopo il parto nelle donne affette da GDM e non sulla base dell'outcome materno e fetale. Nonostante siano stati sollevati alcuni dubbi sul costo-efficacia del trattamento del GDM, una serie di studi clinici ha messo in evidenza come il trattamento intensivo di questa condizione determini outcomes materni e fetali simili a quelli nelle donne gravide non diabetiche [18].

Al primo appuntamento in gravidanza (nel 1° trimestre), a tutte le donne che non riportano determinazioni precedenti viene determinata la glicemia plasmatica per identificare le

¹⁵ Distress Respiratorio: è un danno dei capillari alveolari, determinante grave insufficienza respiratoria con ipossiemia arteriosa, refrattaria alla somministrazione di ossigeno.

¹⁶ Iperbilirubinemia: aumento eccessivo e non controllato della bilirubina, pigmento giallo-rossastro contenuto nella bile che si forma da globuli rossi senescenti e dal catabolismo di emoproteine sieriche.

donne con diabete preesistente alla gravidanza. In *Tabella 2* sono riportati i criteri per la diagnosi del diabete gestazionale.

Tabella 2: Criteri per la diagnosi del diabete mellito gestazionale con carico orale di glucosio da 75 g [19]

	mg/dL	mmol/L
Digiuno	92	5.1
1-h	180	10.0
2-h	153	8.5

A 16-18 settimane di età gestazionale, alle donne con almeno una delle seguenti condizioni:

- diabete gestazionale in una gravidanza precedente
- indice di massa corporea (IMC) pregravidico $\geq 30 \text{ kg/m}^2$
- riscontro, precedentemente o all'inizio della gravidanza, di valori di glicemia plasmatica compresi fra 100 e 125 mg/dL (5.6-6.9 mmol/L)

viene proposto un *Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)* con 75 g di glucosio, e un ulteriore OGTT 75 g a 28 settimane di età gestazionale, se la prima determinazione è risultata normale. Sono quindi considerate affette da diabete gestazionale le donne con uno o più valori di glicemia superiori alle soglie soprariportate.

A 24-28 settimane di età gestazionale viene offerto un OGTT 75 g alle donne con almeno una delle seguenti condizioni:

- età > 25 anni
- indice di massa corporea (IMC) pregravidico $\geq 25 \text{ kg/m}^2$
- macrosomia fetale pregressa ($\geq 4500 \text{ g}$)
- diabete gestazionale in una gravidanza precedente (anche se con determinazione normale a 16-18 settimane)
- anamnesi familiare di diabete (parenti di primo grado con diabete tipo 2)
- famiglia originaria di aree ad alta prevalenza di diabete
- peso alla nascita $>4100 \text{ g}$ o $<2700 \text{ g}$
- glicosuria alla prima visita
- utilizzo di glucocorticoidi
- ipertensione pregravidica o complicante la gravidanza

- sindrome dell'ovaio policistico¹⁷

Analogamente a prima, sono definite affette da diabete gestazionale le donne con uno o più valori di glicemia superiori alle soglie soprariportate.

Uno schema globale per la diagnosi del diabete gestazionale è riportato in *Figura 2* [19].

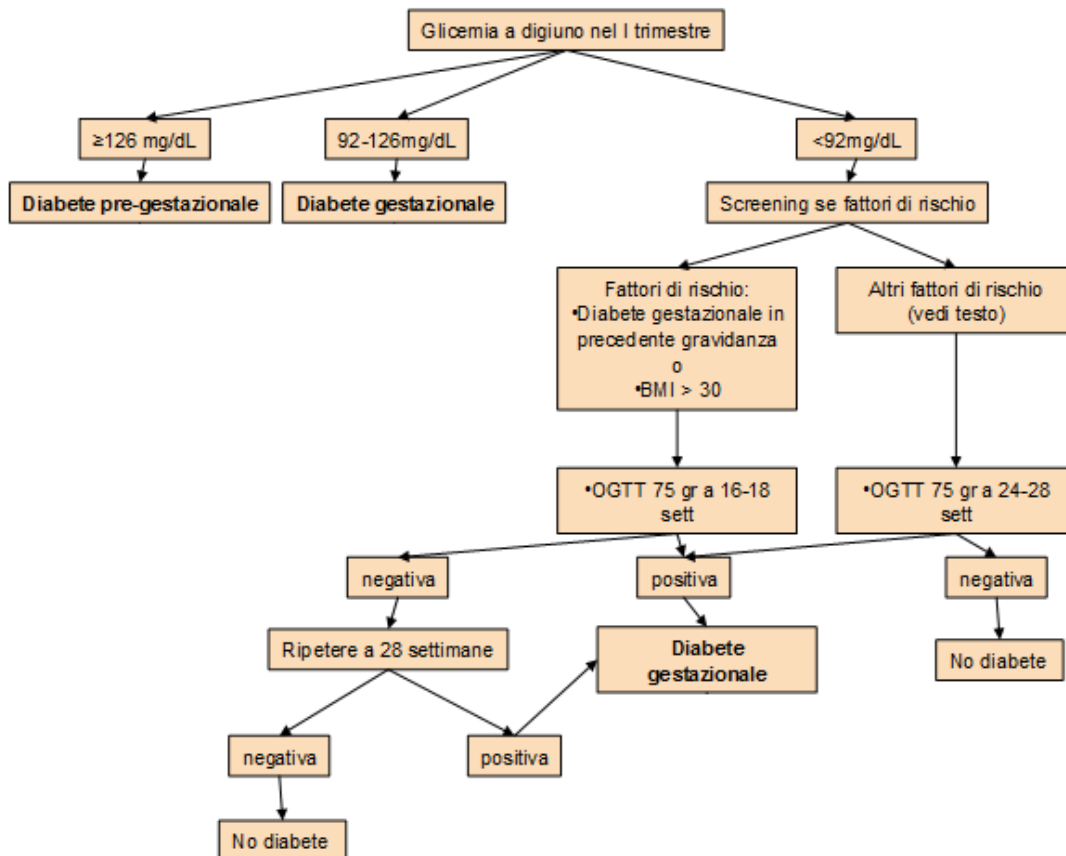


Figura 2: Diagnosi del diabete gestazionale

Infine alle donne cui è stato diagnosticato un diabete gestazionale dovrà essere offerto un OGTT 75 g non prima che siano trascorse sei settimane dal parto, per verificare il ritorno alla normalità dei valori glicemici [20].

Nella maggior parte delle donne con diabete gestazionale la tolleranza al glucosio tornerà normale a gravidanza conclusa e potranno essere classificate come portatrici di una *“precedente anomalia della tolleranza glucidica”* [17].

¹⁷ Ovaio policistico: condizione caratterizzata da ovaie ingrandite e policistiche, cioè ripiene di cisti di varie dimensioni e da tre sintomi quali amenorrea (assenza di mestruazioni), irsutismo (aumento della peluria) ed obesità. In alcune donne si osserva anche una familiarità per la sindrome.

1.3.6. La terapia del diabete gestazionale

Una volta eseguita la diagnosi è importante controllare il diabete gestazionale per evitare complicanze associate; è stato infatti dimostrato che un'appropriata terapia del diabete gestazionale riduce la morbilità materno-fetale (in particolare la macrosomia fetale). Nella maggioranza delle donne il diabete gestazionale viene controllato da modifiche della dieta e dell'attività fisica.

In particolare la terapia nutrizionale consiste in un'appropriata dieta in grado di mantenere la normoglicemia, prevenire la chetosi, evitare l'aumento di peso eccessivo e contribuire al benessere fetale.

Nella pratica clinica si tratta di fornire una dieta di circa 1800-2500 kcal, variabile a seconda del peso della donna, che prevede carboidrati (40%), proteine (20%) e grassi (40%) e che cerca di ridurre l'apporto di zuccheri semplici che comportano un aumento dei livelli di glicemia postprandiale.

L'*American Diabetes Association (ADA)* raccomanda un programma di moderata attività fisica come parte del trattamento della gravida con diabete gestazionale, escludendo altre complicazioni ostetriche. L'attività fisica migliora infatti la sensibilità tissutale all'insulina endogena e quindi aiuta nel controllo glicemico.

La terapia insulinica va iniziata quando i livelli di glicemia superano i target definiti, nonostante la terapia dietetica e l'esercizio fisico. Il dosaggio di insulina varia a seconda di diversi fattori come obesità, appartenenza ad un gruppo etnico specifico, grado di iperglicemia. Anche il tipo di insulina varia a seconda del pattern glicemico riscontrato durante il monitoraggio.

Gli antidiabetici orali come gliburide, acarbosio e metformina possono essere considerati un'alternativa alla terapia insulinica in caso di mancata compliance o rifiuto da parte della paziente dell'assunzione di insulina [19].

1.3.7. Marker elementari nel diabete mellito gestazionale e nelle altre forme di diabete mellito

Alla luce dell'importanza di questa patologia e della conseguente necessità di acquisire più informazioni per la sua prevenzione e terapia, negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi finalizzati all'identificazione di marker in tessuti biologici, caratteristici delle diverse

forme della malattia diabetica. In particolare sono state eseguite molte analisi di matrici biologiche quali sangue e urine di persone con diabete di tipo 1 e 2, spesso riscontrando differenti livelli di concentrazione di determinati elementi chimici (in particolare metallici) in presenza di questa malattia. Considerando che il diabete mellito gestazionale presenta le stesse cause del diabete di tipo 2, ci potremmo attendere risultati analoghi anche per questa forma di diabete a livello placentare. Di particolare importanza è stata quindi una ricerca bibliografica riguardante gli elementi coinvolti in questa sindrome che risultano più o meno concentrati nelle diverse matrici biologiche.

Nei lavori di ricerca condotti recentemente è emerso che lo stato del ferro espresso come percentuale di saturazione di transferrina (principale proteina di trasporto del ferro nel sangue), livello di emoglobina e siero ferrico misurati nel sangue di donne affette da diabete mellito gestazionale risultano maggiori rispetto ad un gruppo di controllo [21].

Analisi condotte sul sangue di persone affette da diabete di tipo 1 e 2 evidenziano una minore concentrazione di Cr, Mn, Ni, Pb e Zn in pazienti affette da diabete di tipo 1 rispetto ad un gruppo di controllo, e una minore concentrazione di Cr, Mn, Ni in pazienti con diabete di tipo 2. Questi risultati suggeriscono che Cr potrebbe essere benefico per la riduzione della perossidazione lipidica, stress ossidativo e per il livello di glucosio. Analogamente, la deficienza di Mn nel sangue potrebbe servire a richiamare Mn per aumentare l'attività dell'enzima Mn-SOD (Mn-superoossido dismutasi) e per normalizzare la sintesi e secrezione d'insulina. Similmente, un supplemento di Zn potrebbe contribuire al controllo glicemico, all'effetto insulino-mimetico e per prevenire danni ossidativi. Infine i livelli non tossici di Ni e Pb trovati nei pazienti diabetici potrebbero essere interpretati come protettivi contro l'assetto della malattia diabetica, in particolare contro le complicazioni del diabete (Pb) e la deregolamentazione del glucosio (Ni) [22].

Risultati discordanti rispetto ai precedenti si riscontrano in un altro articolo in cui la concentrazione di Cr nel siero sanguigno risulta maggiore nei pazienti diabetici, mentre risultano meno concentrati Pb, Cd e Se [23].

In altre analisi del sangue Cr e Ni risultano meno concentrati in pazienti diabetici mentre Cd, Co, Zn, Mn [24] Cu e Fe [25] sono presenti a concentrazioni maggiori.

Anche analizzando altre matrici quali urine e cuoi capelluto, oltre al sangue, emerge che Cd, Pb e As sono maggiormente presenti nelle donne diabetiche e nei loro bambini, anche quando la donna è in stato di gravidanza [26].

Concentrazioni significativamente maggiori di Al, Cd, Cu, Mn, Hg, Ni e significativamente minori di Cr, Co, V sono stati riscontrati analizzando il siero di pazienti diabetici. Analizzando

invece le urine emergono delle maggiori concentrazioni di Cr, As, Cu, Zn e minori di Cd, Co, Pb, Mn, Mo, Ni e Se, anche se differenze significative sono state osservate solo per Cd e Zn [27].

Ulteriori studi confermano la presenza di una maggiore concentrazione di Cd [28] e Pb nel sangue e nelle urine di pazienti diabetici, mentre sono state riscontrate concentrazioni minori di Se [29]. Questi risultati suggeriscono che una maggiore concentrazione di metalli tossici e una minore concentrazione di antiossidanti potrebbero considerarsi dei fattori che contribuiscono alla patogenesi del diabete mellito.

Infine, molte ricerche indicano l'esistenza di una correlazione tra esposizione da As attraverso l'acqua potabile e l'insorgenza del diabete mellito. In particolare sono state riscontrate concentrazioni maggiori di As nelle urine di pazienti con diabete di tipo 2 [30].

Riassumendo, in letteratura sono per ora presenti risultati controversi riguardo l'esistenza di marker elementari in tessuti biologici di pazienti diabetici. Appare quindi necessario approfondire queste ricerche. Bisogna comunque considerare che le matrici analizzate negli articoli di letteratura non sono sempre le stesse per cui i risultati possono non essere paragonabili. In ogni caso, la letteratura suggerisce come possibili marker della malattia diabetica i seguenti elementi: Cr, Mn, Ni, Pb, Zn, Cd, Se, Co, V, Mo, Cu, Fe, As, Al e Hg.

1.4. La placenta umana

La placenta è un organo complesso che permette prima all'embrione e poi al feto di nutrirsi, respirare, eliminare le sostanze di rifiuto e difendersi da sostanze nocive e agenti patogeni (batteri e virus) cui può essere esposto durante la vita in utero. Questo organo svolge importanti funzioni anche per la madre, fornendole gli ormoni necessari per il regolare proseguimento della gravidanza [31].

1.4.1. *Morfologia*

La placenta è un organo transitorio persistendo per circa 266 giorni nell'utero di una gestante, e si trova inserita o sulla parte anteriore o sulla parte posteriore del corpo dell'utero, che sono le aree meglio irrorate.

Fino al quarto mese di gestazione essa occupa circa metà dell'area dell'endometrio¹⁸, mentre a termine di gravidanza ricopre da 1/3 a 1/4 della stessa superficie.

Considerata nel suo complesso, la placenta a termine si presenta come un organo spugnoso, molle, di forma più o meno rotondeggiante, ellissoidale, del peso di circa 500-600 g, con un diametro di 15-20 cm ed uno spessore di 2-3 cm. La sua capacità complessiva è di 330 mL di sangue; si è calcolato che la quantità di sangue che vi scorre è pari circa ad 1 L/min.

La placenta è costituita da una *faccia fetale* ed una *faccia materna*. La prima, rivolta verso la cavità amniotica dove si trova il feto, è grigiastrea, liscia, lucente e costituisce il maggior volume dell'intero organo. La seconda aderisce invece alla parete uterina, è di colore rosso scuro e di spessore inferiore.

La parte materna presenta 10-30 rigonfiamenti definiti *cotiledoni materni*, separati da *solchi intercotiledonari* i quali delimitano gli *spazi intervillosi* in cui circola il sangue materno. Sul versante embrio-fetale la placenta è limitata da una lamina connettivale che prende il nome di *strato corionico (o corion)* che rappresenta l'involucro primitivo che avvolge fin dall'annidamento il gruppo di cellule da cui originerà l'embrione. Esso contiene il punto di attacco del cordone ombelicale da cui si distribuiscono all'intero disco placentare le arterie e le vene ombelicali. La superficie embrio-fetale della placenta e il cordone ombelicale sono rivestiti dall'*amnios* che dà loro un aspetto liscio. Dal contorno della superficie embrio-fetale si diparte la *membrana amnio-coriale*, che forma il sacco ovulare in cui sono racchiusi feto e liquido amniotico (*Figura 3*) [32].

¹⁸ Endometrio: è la membrana mucosa che tappezza la cavità dell'utero e continua con la mucosa che riveste le tube e il canale cervicale; costituisce la sede ove si impianta l'uovo fecondato.

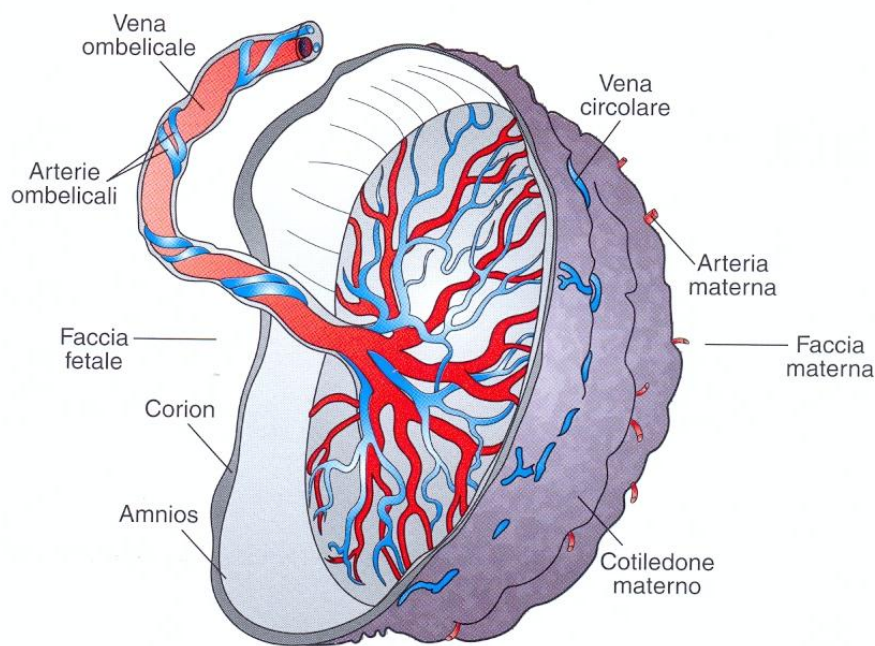


Figura 3: La morfologia placentare: faccia fetale e faccia materna

1.4.2. Modalità di trasporto placentare

Utilizzando diverse tecniche di studio è stato possibile caratterizzare i meccanismi di trasporto attraverso la placenta propri delle diverse sostanze.

I meccanismi conosciuti sono:

- *Diffusione semplice*: movimento passivo di sostanze che passano dal compartimento a concentrazione più elevata a quello a concentrazione più bassa secondo un gradiente chimico o elettrico senza consumo di energia. Questo è il meccanismo utilizzato dai gas respiratori (O_2 , CO_2)
- *Diffusione facilitata*: si intende il processo per cui una proteina trasportatrice di membrana sposta il substrato sempre secondo un gradiente ma con una velocità maggiore rispetto alla diffusione passiva. Anche in questo caso non viene consumata energia.
- *Trasporto attivo*: si verifica contro gradiente di concentrazione e prevede la formazione di un complesso tra la proteina trasportatrice di membrana e il substrato che va trasportato. Tale processo richiede energia.
- *Trasporto mediante organelli*: si verifica soprattutto mediante pinocitosi, attraverso cui la sostanza viene inglobata in una invaginazione della membrana trofoblastica che costituisce la placenta, la attraversa e viene espulsa dalla parte opposta.

1.4.3. Funzioni

La placenta svolge quattro principali funzioni: sintesi di metaboliti, scambi metabolici e gassosi tra madre e feto, passaggio di anticorpi materni al feto, produzione di ormoni.

Metabolismo placentare

La placenta, soprattutto all'inizio della gravidanza, sintetizza il glicogeno, il colesterolo e gli acidi grassi che servono come fonte di nutrimento per l'embrione e per la sintesi di membrane cellulari. La placenta modula il trasferimento di substrati al feto. Tutti i nutrienti, gas, ormoni, elettroliti ed anticorpi che passano dalla madre al feto devono superare questa barriera. Dall'altra parte, tutti i prodotti di rifiuto dal sangue del feto devono passare al sangue materno attraverso questo filtro. L'ossigeno e l'anidride carbonica passano per diffusione passiva. L'ossigeno diffonde dal sangue materno verso quello fetale che presenta una più bassa tensione d'ossigeno, il contrario avviene per l'anidride carbonica. L'acqua passa prevalentemente per osmosi sia nel sangue fetale che nell'amnios, dove serve per il ricambio del liquido amniotico. Gli elettroliti quali sodio, potassio e cloro passano per diffusione passiva, mentre calcio e fosfati, che vengono accumulati preferenzialmente nel feto, probabilmente vengono trasportati per diffusione facilitata. Inoltre la placenta sintetizza e accumula glicogeno a partire dal glucosio. Questi zuccheri attraversano la membrana placentare con meccanismi di trasporto attivo. Sia gli amminoacidi, necessari per la sintesi proteica fetale, sia i precursori dei lipidi fetali attraversano la barriera placentare mediante trasporto attivo. Alcune proteine, tra cui gli anticorpi, possono attraversare la placenta senza venir degradate.

Passaggio di anticorpi materni, virus e batteri patogeni

Il feto non ha un sistema immunitario funzionante e la madre lo protegge trasmettendogli i propri anticorpi. La placenta rappresenta inoltre un potente filtro per i parassiti del sangue, ma è meno efficace contro i virus, batteri e sostanze tossiche trasmissibili al feto dalla madre. Tra i virus che possono attraversare la placenta e infettare il feto troviamo quelli della rosolia, della varicella-zoster, il citomegalovirus e virus associati al morbillo, al vaiolo e alla poliomelite. Anche il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) può in alcuni casi attraversare la placenta da una madre infetta e infettare il feto in utero.

Passaggio di farmaci e sostanze teratogene

La maggior parte dei medicinali e dei metaboliti degli stupefacenti attraversa la placenta senza difficoltà e può danneggiare seriamente l'embrione causando malformazioni congenite. Molti farmaci per uso terapeutico, così come alcune droghe, la nicotina e l'alcool sono teratogeni¹⁹. Inoltre, considerando che la richiesta fetale di nutrimento aumenta con il procedere della gestazione, la potenziale intossicazione placenta-feto con sostanze tossiche può diventare più significativa con il progredire della gravidanza.

Produzione di ormoni

La placenta assume un ruolo endocrino fondamentale nell'attività ormonale materna durante la gravidanza. Gli ormoni prodotti riprogrammano la fisiologia della madre durante la gravidanza influenzando la crescita dei vasi sanguigni materni, l'ematopoiesi²⁰, la risposta immunitaria al feto, il metabolismo, la produzione di steroidi, il comportamento e lo sviluppo delle ghiandole mammarie, in modo da assicurare l'appropriato apporto di nutrienti e ossigeno necessari per l'accrescimento dell'embrione. La placenta produce sia ormoni proteici che steroidei.

Gli ormoni proteici della placenta sono:

- la *gonadotropina corionica umana (hCG)* la cui funzione principale è il mantenimento del corpo luteo;
- il *lattogeno placentare umano (hPL)* o somatomammotropina corionica umana (hCS) che stimola lo sviluppo della mammella e ha un'azione a livello del metabolismo degli zuccheri, riducendo nella madre la sensibilità all'insulina in modo da aumentare la glicemia nel sangue materno ed assicurare così un continuo rifornimento di zuccheri al feto (la qual cosa, come già anticipato, è talvolta in grado di provocare diabete nella madre);
- la *tireotropina corionica umana (hCT)* che determina un aumento della secrezione dell'ormone tiroideo, importante a sua volta perché stimola i processi "anabolici", cioè di crescita, sviluppo e movimento dell'organismo;

¹⁹ Sostanza teratogena: sostanza in grado di danneggiare il feto a dosi innocue per la madre.

²⁰ Ematopoiesi: Insieme dei processi di proliferazione e differenziazione cellulare che, in condizioni definitive di sviluppo, hanno luogo nel midollo osseo e negli organi linfoidei e che portano alla formazione delle cellule circolanti nel sangue: globuli rossi, globuli bianchi, piastrine.

- la *corticotropina corionica umana (hCC)* che si ipotizza aumenti i livelli di colesterolo e di pregnenolone, necessari per “costruire” tutti gli altri ormoni steroidei della placenta.

Gli ormoni steroidei prodotti dalla placenta sono:

- il *progesterone* che può essere definito come l’“ormone della gravidanza”. È infatti indispensabile per il suo mantenimento e la sua prosecuzione, tanto che la somministrazione di inibitori della sua sintesi o di anticorpi anti-progesterone provoca l’interruzione della gravidanza. Esso agisce sulla muscolatura dell’utero mantenendolo in uno stato di relativa quiescenza ed atonia per la maggior parte della gravidanza impedendo il distacco della placenta. Tuttavia, la sua funzione essenziale sembra essere collegata alla sua capacità di inibire la risposta dei linfociti T cellulo-mediata, importante per evitare che il feto, che porta in sé per metà il patrimonio genetico paterno, possa essere considerato “estraneo” e venga quindi rigettato dal sistema immunitario della madre;
- gli *estrogeni (estradiolo)* che aumentano il flusso di sangue utero-placentare e stimolano la crescita uterina e lo sviluppo della ghiandola mammaria.

Infine la placenta produce *α -endorfine*, polipeptidi che causano vasodilatazione, e *prostaglandine*, acidi grassi derivati dell’acido arachidonico, che sembrano essere coinvolte nel proseguimento della gravidanza e nell’inizio del travaglio del parto [31].

1.4.4. *Circolazione sanguigna nella placenta*

Uno schema della circolazione sanguigna della placenta è riportato in *Figura 4*. I villi della placenta sono vascolarizzati dalle arterie ombelicali (due nella maggior parte dei casi) e dalla vena ombelicale. Quest’ultima porta il sangue arterioso dalla placenta al feto mentre le arterie ombelicali portano il sangue venoso reflu dal feto alla placenta, dove si avrà il passaggio di anidride carbonica e prodotti del catabolismo fetale dal circolo fetale a quello materno. Le sostanze nutritive, l’ossigeno, gli ormoni, le immunoglobuline IgG passano dal sangue materno a quello fetale. In condizioni fisiologiche non vi è mai mescolamento tra il sangue materno e quello fetale. I tessuti che separano i due flussi sanguigni materno e fetale, formano la cosiddetta *barriera emato-placentare*. In condizioni normali le lacune sanguigne contengono complessivamente circa 150 mL di sangue che viene continuamente rinnovato con un rapido flusso che permette il passaggio di circa mezzo litro di sangue per

minuto. Il benessere dell'embrione dipende da un'adeguata irrorazione dei villi embrionali da parte del sangue materno. Una riduzione della circolazione utero-placentare porta ad ipossia dell'embrione con un conseguente ritardo dell'accrescimento intrauterino; riduzioni più significative possono portare alla morte del feto [31].

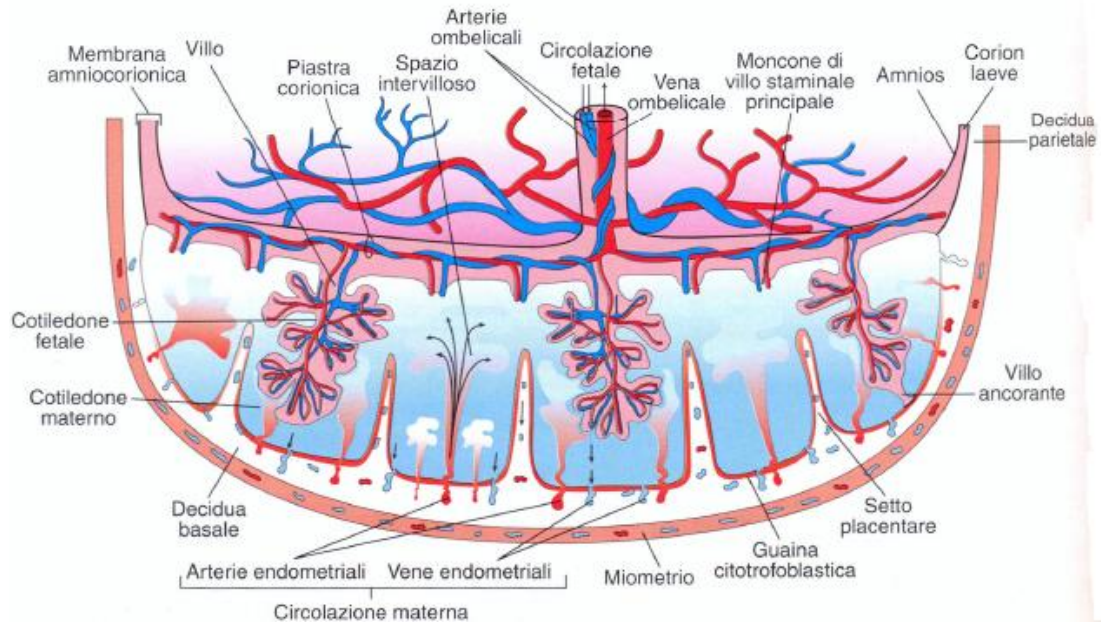


Figura 4: Circolazione sanguigna nella placenta umana

1.4.5. Secondamento

Con il termine secondamento si definisce l'ultima fase del parto caratterizzata dall'espulsione della placenta e delle membrane annessiali. Il secondamento si manifesta dopo circa 10 minuti dalla nascita del feto, in seguito alla ripresa delle contrazioni extrauterine. Il secondamento si compie in tre tappe successive:

- distacco della placenta dalla sua sede di inserzione sulla parete uterina con sua successiva migrazione verso il segmento inferiore
- migrazione della placenta dal segmento inferiore alla vagina
- espulsione della placenta e delle membrane al di fuori della vulva [32]

1.4.6. *La placenta diabetica*

Come già sottolineato nei paragrafi precedenti, le patologie del metabolismo glucidico rappresentano la più comune complicanza della gestazione. Nelle donne gravide diabetiche, le dimensioni, il peso e l'aspetto della placenta sono normali in circa la metà dei casi. Questo fa sì che il patologo non possa riconoscere molti casi di diabete gestazionale. Il pattern morfologico che con più chiarezza pone il sospetto di diabete in gravidanza è costituito da una placenta anomala per incremento dimensionale (placenta pesante, larga e spessa) e modificazioni della consistenza e del colorito (placenta pallida e friabile, a causa di un decremento del contenuto di collagene). Infine il cordone ombelicale in donne con diabete ha uno spessore aumentato e, più frequentemente che nella popolazione generale, può presentare un'arteria ombelicale unica anziché due.

1.4.7. *Composizione elementare della placenta*

Essendo un tessuto biologico, la placenta è costituita prevalentemente da C, H, O, S e P. Per quanto riguarda il contenuto di altri elementi, emerge dalla letteratura la mancanza di uno screening completo. La *Tabella 3* riassume le informazioni raccolte dalla letteratura disponibile fino a dicembre 2013.

Tabella 3: Dati di letteratura (aggiornati a dicembre 2013) riguardanti la composizione elementare media e gli intervalli di concentrazione rilevati in placente umane

Elemento	Concentrazione media (ppm)	Intervallo di concentrazioni (ppm)	Riferimento
Ca	>1000		[33]
K	>1000		[33]
Na	>1000		[33]
P	>1000		[33]
S	>1000		[33]
Fe	630		[33]
Mg	531	360-770	[34]
Zn	67	51-79	[34]
Cu	5.3	3.9-6.6	[34]
Rb	2.52	1.8-3.5	[35]
Se	1.4	1.1-2.3	[34]
Mn	0.59	0.36-1.5	[34]
Sr*	1.04	0.14-17.39	[33]
Al	0.5	0.25-4.3	[36]
As	0.153	0.017-0.929	[34]
Cd	0.130	0.040-0.492	[34]

Pb*	0.08	0.03-0.57	[33]
Ba*	0.05	0.002-1.26	[33]
Ni*	0.024	0.005-0.377	[33]
Cr	0.042	0.021-0.064	[37]
Hg	0.00729	0.0003-0.052	[35]
Mo	0.0056	0.0029-0.011	[38]
Co	0.0054	0.0012-0.0188	[38]
Cl	0.2%	0.16-0.26%	[35]
Br	4.74	2.8-13.2	[35]

* Concentrazione mediana (ppm)

Un articolo riporta anche la presenza di lantanidi e Sc, in concentrazioni dell'ordine dei ppb. In particolare i lantanidi più leggeri (La-Sm) risultano presenti nella maggior parte dei campioni analizzati mentre quelli più pesanti (Eu-Lu) non vengono rivelati nella maggior parte dei tessuti [39].

I risultati riassunti in *Tabella 3* non sono sempre confrontabili in quanto ottenuti con strumentazione differente (ICP-AES, ICP-MS, assorbimento atomico, attivazione neutronica) ed in Paesi diversi. Inoltre le concentrazioni sono talvolta espresse su base *secca* (ossia facendo riferimento al peso del campione secco), mentre in alcuni casi (come ad esempio per Cr, Co, Mo) sono date su base *bagnata*. Infine, nessun lavoro tra quelli citati riporta uno screening completo elementare, ma limita i risultati a un gruppo ristretto di elementi o di metalli.

1.4.8. *Biochimica di alcuni elementi rilevanti nella placenta*

Alluminio - L'Alluminio rappresenta uno dei tre metalli più abbondanti sulla crosta terrestre; è un elemento *non essenziale*, in quanto la sua assenza nella nutrizione non influenza la crescita dell'organismo. Negli ultimi due decenni è stato invece riconosciuto come importante metallo tossico. Studi su animali suggeriscono che eccessive esposizioni da alluminio durante i primi periodi di sviluppo fetale possono essere causa di fetotossicità.

Inoltre l'accumulo di alluminio nelle ossa provoca danni alle stesse. Questo metallo è stato anche implicato come fattore di rischio in alcune malattie neurodegenerative, come l'Alzheimer. Infine l'alluminio può promuovere la formazione dei ROS, portando ad un aumento dello stress ossidativo nel cervello. Nonostante tali potenziali fattori di rischio, anche per il feto, sostanzialmente non si conosce la capacità della placenta di agire o meno come barriera a questo metallo [36].

Arsenico – L'arsenico è un elemento tossico che si può trovare in forma organica o inorganica. Le forme inorganiche sono predominanti sulla superficie e nelle falde acquifere e sono più tossiche di quelle organiche. Oltre che nell'acqua si può trovare arsenico nel tabacco, nei prodotti farmaceutici, nei pesticidi e negli additivi; il cibo contaminato da arsenico rappresenta un problema a livello mondiale.

Studi epidemiologici hanno dimostrato che esiste una correlazione tra esposizione prolungata all'arsenico nell'acqua potabile e aumento di malattie croniche, incluso il cancro, malattie del sistema nervoso, disfunzioni endocrine; inoltre diversi studi indicano l'esistenza di una correlazione dose-risposta tra esposizione all'arsenico e prevalenza del diabete mellito [30].

Studi eseguiti sia su animali che su umani hanno mostrato che As attraversa la placenta nella forma inorganica. Una volta raggiunto il tessuto fetale As viene convertito nella forma organica, meno tossica. In altre parole la metilazione risulta essere il più importante meccanismo di detossificazione e, conseguentemente, riduce la tossicità legata a questo elemento. Per diversi motivi, la forma organica non sembra attraversare la placenta, per cui essa può essere immagazzinata in questo organo.

Studi condotti in diversi Paesi supportano l'evidenza di una tossicità placentare dovuta alla presenza di As, con conseguenti outcome sulla riproduzione (aborto spontaneo, malformazioni congenite, basso peso alla nascita). La causa di queste complicanze in gravidanza sembra essere legata al fatto che questo elemento, attraverso interazione con gruppi sulfidrilici, riduce l'attività del glutatone e aumenta la perossidazione lipidica nella placenta, processi che favoriscono la formazione di radicali.

Cadmio – Il cadmio è presente nella crosta terrestre. La maggior parte del cadmio utilizzato negli Stati Uniti viene estratto come sottoprodotto durante la produzione di altri metalli, come Zn, Pb e Cu. Le maggiori fonti di esposizione a questo metallo da parte dell'uomo comprendono il cibo contaminato, il fumo di sigaretta e l'inquinamento industriale; Cd può entrare nel corpo attraverso la pelle, i polmoni, l'intestino. Sebbene la funzione biologica del cadmio non è nota, la sua tossicità negli animali e umani è invece bene conosciuta.

Studi condotti sia su animali che su umani indicano che anche la placenta è un organo target per la tossicità del Cd. A dosi moderate, Cd viene sufficientemente filtrato dalla placenta, mentre a dosi elevate è in grado di attraversarla, causando tossicità fetale. La riduzione del flusso sanguigno uteroplacentare, la riduzione del trasporto di nutrienti e la tossicità placentare causate da questo elemento sembrano essere i maggiori fattori

contribuenti al ridotto peso e alla tossicità fetale, alle malformazioni e alla morte. Infatti anche l'accumulo di piccole quantità di Cd possono essere sufficienti per inibire la sintesi embrionica di DNA e proteine [40].

Piombo –Grazie alle sue inusuali proprietà chimico-fisiche il piombo viene utilizzato in diverse applicazioni industriali. Ben conosciuto è ad esempio il suo utilizzo come schermo per le radiazioni. Il piombo è un metallo tossico per animali e uomo e la sua persistenza causa una presenza prolungata nell'ambiente, nell'acqua, terra, polvere e nei prodotti manifatturieri. Ciò in particolare rappresenta un serio pericolo per i bambini nei quali l'assorbimento gastrointestinale è molto maggiore che negli adulti. La tossicità del piombo viene prevalentemente diagnosticata attraverso elevati livelli nel sangue che se maggiori o uguali di 10 µg/L (0.48 µmol/L) sono considerati tossici e possono provocare disordini neurologici, invalidità cognitive, ipertensione e altri disordini.

Dopo l'assorbimento, questo metallo viene distribuito alla maggior parte dei tessuti, ma si deposita principalmente nello scheletro, nei reni e nel cervello.

L'esposizione al piombo nelle donne incinta avviene generalmente per ingestione o inalazione. È risaputo che l'elemento è in grado di attraversare la placenta e accumularsi nel cervello fetale a causa di uno sviluppo parziale o di una totale mancanza della *BBB* (*Blood-Brain Barrier*).

L'esatto meccanismo coinvolto nella tossicità placentare resta sconosciuto; in genere il piombo produce intossicazioni interferendo con la biosintesi di proteine/emoproteine e inibendo gli enzimi di membrana e mitocondriali. Inoltre è risaputo che Pb causa deficit nelle funzioni colinergiche, dopaminergiche e glutamatergiche. Infine l'esposizione *in utero* può avere effetti sullo sviluppo del feto. Il sistema nervoso è il principale target di questo elemento tossico. L'esposizione nelle donne incinta a bassi livelli di Pb è stato associato ad un aumento nell'incidenza di nascita pretermine e ridotto peso del neonato, mentre l'esposizione ad alti livelli può essere causa di infertilità, morbidità neonatale e aborto spontaneo. È stato dimostrato che Pb può interferire con i primi stadi di sviluppo del feto, come l'invasione dell'ovulo fertilizzato nell'utero [40].

Mercurio - Il mercurio è un metallo non essenziale e tossico, le cui fonti includono le industrie, miniere, rifornimenti medici, adesivi, colle e fungicidi. Di conseguenza Hg è un contaminante ampiamente diffuso nell'ambiente e compromette sia l'ecosistema acquatico che la salute umana. Nella maggior parte dei prodotti alimentari Hg si trova nella forma

organica. Pesci, mammiferi marini e alcuni microorganismi convertono Hg elementare nella forma organica, che si accumula nella catena alimentare. Nell'essere umano la forma organica può essere convertita nella meno tossica forma inorganica.

Ci sono evidenze che la placenta umana, che contiene delle specifiche proteine metallo-legante (metallotionine, proteine a basso peso molecolare ricche di cisteine) in grado di legare fortemente lo ione mercurio, funge da barriera a tale metallo.

Le forme organiche e metalliche di questo elemento attraversano la placenta più rapidamente rispetto alla forma inorganica. Di conseguenza, MeHg e Hg metallico si accumulano nel feto, mentre Hg inorganico si accumula nella placenta. Hg metallico, dopo aver attraversato la placenta, può essere ossidato a Hg^{2+} nel tessuto fetale. È stato dimostrato che Hg^{2+} si accumula nella placenta e inibisce l'*uptake* fetale di alcuni metaboliti essenziali.

Studi condotti sia su animali che su umani hanno dimostrato che MeHg già a livelli di esposizione moderata presenta una forte neurotossicità e tossicità sullo sviluppo del feto (soprattutto a livello del cervello). D'altra parte, l'esposizione a Hg da parte di donne incinta comporta severi deficit di sviluppo e comportamento nel feto, anche senza sintomi di avvelenamento nella madre. I comuni difetti dello sviluppo causati dall'esposizione a mercurio sono il ridotto peso alla nascita, atassia (deficit nel coordinamento motorio) e deformità degli arti. Il mercurio provoca effetti neurocomportamentali incluso un severo ritardo mentale, deficit sensoriale e motorio, paralisi cerebrale, plasticità, sordità e cecità. [40].

Nickel – Il nickel viene usato principalmente nelle leghe in quanto conferisce loro le proprietà di resistenza termica, durezza e robustezza. I suoi sali sono usati nelle leghe di acciaio, nelle batterie alcaline, nelle ceramiche e come catalizzatori. La popolazione è esposta al nickel attraverso il cibo, l'acqua, l'aria ed il tabacco a livelli molto bassi. Dati suggeriscono che il nickel si bioconcentra nei pesci e negli organismi acquatici che quindi possono rappresentare una potenziale via di esposizione. I lavoratori nelle industrie che producono, trattano o usano il nickel sono generalmente esposti ad alti livelli di questo metallo, per cui sono soggetti ad un rischio maggiore.

Il Ni è un elemento essenziale per molti esseri viventi incluso l'uomo, sebbene le basi molecolari delle sue funzioni non siano ancora note. Non è peraltro sorprendente che la deficienza da nickel nell'uomo non sia mai stata riportata, probabilmente perché il normale apporto supera di gran lunga la richiesta metabolica stimata di 25-35 μg /giorno [41]. Al

contrario, ad alte concentrazioni l'elemento produce effetti deleteri, che includono delle semplici reazioni allergiche ed arrivano a complicanze più gravi quali aborto, difetti nel feto e cancro. Quest'ultimo sembra essere causato da meccanismi epigenetici, che coinvolgono la sostituzione Ni(II)-Fe(II) nelle non-eme ferro diossigenasi, enzimi coinvolti nella demetilazione del DNA e degli istoni [41].

L'effetto della tossicità del Ni sulla placenta non è stato ben studiato come è avvenuto nel caso di altri metalli. Diversi studi condotti su animali testimoniano però la sua tossicità, in quanto può provocare una diminuzione del peso del feto, mortalità embrionica, malformazioni teratogeniche, diminuzione del periodo di gestazione, ossificazione ritardata e malformazioni dello scheletro.

Cromo - Il cromo, uno degli elementi più comuni sulla terra, esiste in diversi stati ossidativi, fra cui quelli più importanti e stabili sono 0 (metallo elementare), III e VIII. Cr (0), rappresenta la forma meno comune, non è presente naturalmente e non è riconosciuto causare rischi alla salute. Cr (III) è, a basse dosi, un elemento essenziale, e si trova in molti cibi freschi, incluso il pane, carne, vegetali e acqua potabile. Ad esempio, Cr(III) ha un ruolo benefico nelle sindromi metaboliche, nelle malattie cardiovascolari e nella regolazione dell'insulina, e quindi gioca un ruolo importante nel metabolismo del glucosio. Infatti è stato trovato che bassi livelli di questo metallo sono correlati ad una maggiore incidenza di diabete tipo 2.

Cr(VI) è invece tossico. Oltre ad alcuni effetti tossici acuti, esso è riconosciuto essere un carcinogeno per l'uomo; può causare cancro ai polmoni e allo stomaco se ingerito attraverso l'acqua potabile [42].

Cobalto - Il cobalto forma molti composti organici e inorganici in cui i numeri di ossidazione più frequenti sono +3 [Co(III)] e +2 [Co(II)]. Il cobalto è essenziale per l'uomo, ma allo stesso tempo per tale elemento sono riconosciuti effetti tossici, comunque meno rilevanti che non per altri metalli [42].

Ferro - Il ferro si trova principalmente negli stati di ossidazione +2 e +3, ed è un elemento essenziale per l'uomo essendo presente come elemento chiave nel sito catalitico di molti enzimi e nelle proteine che trasportano ossigeno nelle cellule.

Circa il 65% del ferro presente nell'organismo umano è legato all'emoglobina, il 10% è un costituente della mioglobina, citocromi e altri enzimi e il 25% è legato a proteine adibite al

suo immagazzinamento, *ferritina* e *omosiderina*. Circa lo 0.1% del ferro è legato alla *transferrina*, la principale proteina adibita al suo trasporto nel circolo sanguigno.

Anche questo elemento, come tutti quelli essenziali, diviene dannoso se presente in eccesso, causando danni tissutali grazie alla sua capacità di mediare reazioni che producono radicali liberi in vivo.

Il metabolismo del ferro risulta particolarmente alterato nelle persone affette da diabete tipo 2, ed inoltre interferisce con il metabolismo del glucosio.

Zinco – Il numero di ossidazione più comune dello Zn è +2 [Zn(II)]. Lo zinco è un elemento ubiquitario e si trova in piante e animali. Il corpo adulto umano contiene all'incirca 1.5-2.5 g di zinco, che si trova presente in tutti gli organi, tessuti e fluidi. Zn è un elemento essenziale che esplica la sua funzione in più di 70 differenti enzimi coinvolti nel metabolismo di carboidrati, proteine e lipidi. Inoltre lo zinco è coinvolto nel controllo dell'azione insulinica e della concentrazione sanguigna del glucosio [42].

La mancanza di questo elemento è stata associata a complicazioni durante la gravidanza e il parto oltre che a ritardi nella crescita e anomalie congenite nel feto. Durante la gravidanza c'è un calo del livello di zinco nella circolazione materna, che aumenta con il progredire della stessa, probabilmente a causa della diminuzione della concentrazione di zinco legato e all'aumento del trasferimento dello stesso dalla madre al feto.

Diversi studi hanno dimostrato una relazione tra bassa concentrazione di zinco in gravidanza e ridotto peso del neonato, suggerendo l'esistenza di una soglia per la concentrazione di zinco sotto la quale aumentano significativamente gli esiti negativi in gravidanza [43].

Rame – I numeri di ossidazione più frequenti del rame negli organismi viventi sono +2 e +1. Questo metallo è un elemento essenziale in quanto cofattore di molti enzimi coinvolti in reazioni redox, come la *citocromo c ossidasi*, l'*ascorbato ossidasi* e la *superossido dismutasi*. Oltre ad essere un elemento essenziale, il rame può causare effetti tossici in quanto catalizza la formazione di specie radicaliche ROS. Livelli di *ceruplasmina* (proteina deputata al trasporto del rame nel sangue) maggiori del normale sono stati osservati in soggetti affetti sia da diabete tipo 1 che tipo 2. Inoltre alcuni studi riportano maggiori concentrazioni di rame nel sangue di pazienti diabetici con complicazioni quali ipertensione e retinopatia. Il feto è completamente dipendente dal rifornimento di rame materno. Un deficit di rame durante lo sviluppo embrionale e fetale può essere causa di diverse anomalie biochimiche e

metaboliche al feto stesso, oltre che difetti alla nascita. È stato documentato che la gravidanza è associata ad una condizione di maggiore ritenzione di questo elemento, che può essere in parte dovuta ad una diminuzione nell'eliminazione biliare dello stesso, indotta a sua volta dai cambiamenti ormonali che hanno luogo durante la gravidanza [43].

Magnesio - Il magnesio è uno dei micronutrienti essenziali per la corretta funzionalità dell'organismo. È il quarto catione più abbondante nel corpo e il secondo nei compartimenti intracellulari, dove serve come attivatore per più di 300 processi enzimatici, nella trasmissione neuromuscolare e nella contrazione muscolare. Inoltre riveste un ruolo molto importante nella sintesi di proteine, grassi e acidi nucleici ed è un componente strutturale delle ossa [44].

Il magnesio sembra anche giocare un ruolo importante nel metabolismo del glucosio e nell'omeostasi dell'insulina. Infatti studi epidemiologici indicano che il ridotto consumo di magnesio potrebbe essere un fattore di rischio per lo sviluppo del diabete mellito tipo 2 [45].

La concentrazione di magnesio nelle donne in gravidanza riveste un ruolo essenziale per il benessere del bambino. Deficienze da magnesio in gravidanza potrebbero essere associate alla preeclampsia, al parto pretermine e a un ridotto peso alla nascita del bambino. È stato ampiamente documentato che una deficienza da magnesio durante il periodo gestazionale aumenta notevolmente il rischio di mortalità e morbidità neonatale [43].

Selenio – Il selenio è un elemento essenziale per la salute umana in quanto componente essenziale nel metabolismo dell'ormone tiroideo e nel funzionamento del sistema immunitario [46]; inoltre riveste un ruolo importante nel sistema di difesa antiossidante, in quanto agisce come cofattore negli enzimi *glutathione perossidasi* (GPX1, GPX2, GPX3 e GPX4). Altre proteine che contengono questo elemento sono la *tioredoxina reduttasi* (TR) e la *iodotironina 5'-deiodinasi* [47].

Alcuni studi hanno dimostrato che una deficienza da selenio è collegata ad esiti negativi in gravidanza, parto pretermine e aborto spontaneo [47] e può inoltre predisporre la madre alla preeclampsia [48]. Una combinata deficienza di iodio e selenio può avere effetti avversi sulla crescita neonatale e sullo sviluppo e sopravvivenza del neonato. Al contrario, elevate concentrazioni di selenio nel plasma sembrano benefiche in quanto hanno dimostrato diminuire la tossicità di metalli pesanti [47].

Vanadio – Il vanadio è presente nell'ambiente sotto forma di numerosi stati di ossidazione. Tutti i tipi di composti di vanadio sono considerati tossici ad alte dosi, anche se non di tutti è stato completamente studiato un possibile ruolo a livello biologico (inclusa la tossicità). È stato documentato che il vanadil solfato aiuta a controllare i livelli di glucosio in pazienti con diabete tipo 2; molti composti del vanadio sono stati quindi proposti come insulino-mimetici [49].

Manganese – Il manganese è un nutriente essenziale in diverse specie animali e nell'uomo in quanto è richiesto per il normale metabolismo di amminoacidi, lipidi, proteine e carboidrati [50] dove funge da attivatore e cofattore in diverse reazioni enzimatiche. La deficienza da manganese è stata associata a numerosi effetti tossici, tra i quali si può menzionare un'aumentata mortalità infantile se tale deficienza avviene durante la gravidanza [51]. La concentrazione di manganese nel sangue materno aumenta durante la gravidanza a causa dell'aumentata domanda fetale; la placenta, in questo senso, sembra agire da trasportatore attivo di manganese.

Molibdeno – Il molibdeno è un elemento essenziale sia per le piante che per gli animali. Nei mammiferi il molibdeno è presente in diverse metallo-proteine. In piccole quantità sembra attraversare la barriera placentare [52]. Per quanto riguarda la tossicità a dosi elevate, essa dipende essenzialmente dalla forma chimica in cui si trova l'elemento. In molti casi i sintomi somigliano a quelli causati da una deficienza di rame [52].

Lantanidi – Negli ultimi anni l'interesse nella misura dei lantanidi in tessuti umani e fluidi corporei è cresciuto notevolmente a causa del loro uso sempre maggiore in diverse applicazioni industriali e tecnologiche che possono rappresentare una via di esposizione all'uomo. Questi elementi sono utilizzati in diverse applicazioni sintetiche, grazie alle loro proprietà magnetiche, ottiche e catalitiche; sono usati nel settore dell'elettronica, nei superconduttori, supermagneti, laser, computer, vetro e ceramica, ecc.... vengono sfruttati anche in ambito terapeutico, ad esempio nella cura del cancro. Tuttavia l'esposizione eccessiva a questi elementi non-essenziali può avere effetti avversi sulla salute umana. Essendo molto simili allo ione Ca^{2+} in termini di dimensioni, caratteristiche di legame e geometria di coordinazione, i lantanidi possono sostituirlo in alcune circostanze. A causa della loro maggiore carica, si legano alle molecole d'acqua più

fortemente rispetto allo ione Ca^{2+} ; possono inoltre arrestare l'attività del Ca interagendo con i recettori Ca-specifici e con i canali transmembrana [39].

1.5. Strumentazione ICP-MS

1.5.1. *Introduzione e vantaggi della tecnica*

La spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (*ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) è una tecnica analitica basata sull'utilizzo della spettrometria di massa abbinata al plasma accoppiato induttivamente. Nata nei primi anni '80, si è costantemente evoluta, fino a diventare ad essere oggi giorno la tecnica più importante per l'analisi degli elementi, grazie ai suoi bassi limiti di rivelabilità per la maggior parte degli elementi, all'elevata sensibilità, alla buona precisione e accuratezza, alla velocità d'analisi, all'elevata selettività ed alla capacità di distinguere isotopi dello stesso elemento. Diversamente dall'assorbimento atomico, che può misurare un solo elemento per volta, l'ICP-MS consente la determinazione simultanea degli elementi con il conseguente vantaggio di velocizzare tale tipo di analisi [53].

Quasi tutti gli elementi della tabella periodica, inclusi anche numerosi non-metalli, sono analizzabili via ICP-MS. Alcuni, come P, B, Si, S ed alogeni sono determinabili con ripetibilità e/o con limiti di rivelabilità piuttosto modesti; gli unici non determinabili sono H, C, N, F, O, Ar ed He.

Questa tecnica sfrutta l'utilizzo di una torcia al plasma ICP per produrre la ionizzazione e di uno spettrometro di massa per la separazione e rivelazione degli ioni prodotti.

1.5.2. *Introduzione del campione*

Il campione viene inizialmente aspirato mediante una piccola pompa peristaltica e portato ad un nebulizzatore. L'aerosol prodotto viene quindi fatto passare in una apposita camera (*camera spray*) in modo da ottenere gocce molto piccole e di dimensioni pressoché costanti. L'analita subisce quindi l'evaporazione dalla fase liquida cui segue l'atomizzazione. Gli atomi prodotti subiscono poi un processo di ionizzazione per interazione con gli ioni di argon presenti nel plasma, che viene raggiunto mediante un flusso di argon a circa 1 mL/min attraverso il tubo di quarzo centrale.

1.5.3. La sorgente a plasma

In *Figura 5* è riportato lo schema di una sorgente a plasma accoppiato induttivamente, chiamata *torcia*.

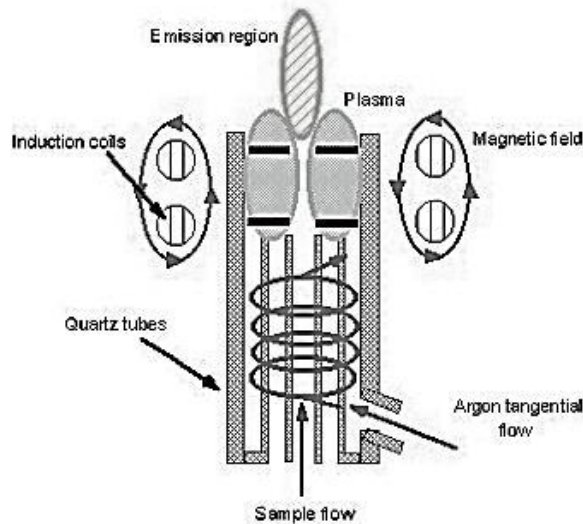


Figura 5: Sorgente al plasma accoppiato induttivamente

È costituita da tre tubi di quarzo concentrici, nei quali scorre argon con un flusso di 12-17 L/min [54]. Il tubo più grande ha un diametro di circa 2.5 cm e la sua estremità superiore è circondata da una bobina di induzione raffreddata ad acqua e alimentata da un generatore di radiofrequenze che negli strumenti commerciali lavora a 40.68 MHz, frequenza alla quale si ottiene la miglior efficienza di accoppiamento tra la bobina e il plasma. La ionizzazione dell'argon è iniziata con una scintilla prodotta da una bobina Tesla (dispositivo in grado di produrre correnti elettriche a tensioni e frequenze molto elevate); gli ioni che si formano e i loro elettroni interagiscono poi con il campo magnetico fluttuante prodotto dalla bobina di induzione. Questa interazione costringe gli ioni e gli elettroni che si trovano nello spazio all'interno della bobina a percorrere un moto circolare; la conseguenza della loro resistenza a questo movimento è un riscaldamento ohmico del plasma, che è in grado di raggiungere temperature dell'ordine dei 6000-10000 K. L'isolamento viene realizzato facendo fluire argon tangenzialmente attorno alle pareti del tubo. Il flusso tangenziale consente sia di raffreddare le pareti interne del tubo centrale che di sostenere il plasma stesso.

1.5.4. Interfaccia plasma-spettrometro di massa

La parte critica dello strumento è costituita dall'interfaccia che collega la torcia ICP, che funziona a pressione atmosferica, con lo spettrometro di massa, che richiede invece una pressione inferiore a 10^{-4} torr. Questo collegamento viene eseguito mediante un *cono di*

campionamento, costituito da un cono di nickel raffreddato ad acqua avente un piccolo orifizio (< 1.0 mm) al centro. Il plasma è convogliato, attraverso questo orifizio, in una zona mantenuta ad una pressione di 1 torr attraverso una pompa meccanica. In questa regione si ha la rapida espansione del gas, che quindi si raffredda. Una frazione del gas presente in questa regione passa poi, attraverso un piccolo foro presente su un secondo cono (*scrematore*), in una camera mantenuta alla stessa pressione dello spettrometro di massa.

1.5.5. *La cella di collisione*

La cella di collisione è costituita da un ottupolo ed ha la funzione di eliminare le interferenze dovute alla presenza di ioni poliatomici che si sono formati nel plasma per interazione dell'argon con gli elementi presenti nel campione e che possono interferire con ioni di interesse analitico. Ad esempio, nel plasma si producono $^{40}\text{Ar}^+$ ed $^{38}\text{ArH}^+$ che interferiscono rispettivamente con $^{40}\text{Ca}^+$ e $^{39}\text{K}^+$ [54].

1.5.6. *L'analizzatore di massa*

In generale esistono diversi modi per separare ioni con rapporti massa/carica differenti. Nel nostro caso l'analizzatore è un quadrupolo, costituito da quattro barre cilindriche parallele che fungono da elettrodi. Le barre opposte sono collegate elettricamente tra loro, una coppia al polo positivo di un generatore variabile in corrente continua, l'altra coppia al polo negativo; inoltre, ad ogni coppia di barre è applicato un potenziale variabile in corrente alternata a radiofrequenza. Per ottenere con tale dispositivo uno spettro di massa, gli ioni vengono accelerati nello spazio tra le barre applicando una differenza di potenziale da 5 a 10 V, mentre i potenziali sulle barre in corrente continua e in corrente alternata sono aumentati simultaneamente mantenendo costante il loro rapporto. In un determinato istante si ha che tutti gli ioni, tranne quelli con un certo valore di m/z , colpiscono le barre e sono convertiti in molecole neutre; pertanto solo gli ioni il cui valore m/z è compreso in un ristretto intervallo raggiungono il rivelatore.

I voltaggi sono aumentati molto rapidamente per cui il quadrupolo può scansionare l'intero intervallo di massa (che per l'analisi elementare può essere compreso nell'intervallo 2-260 uma) in 100 ms [55].

Generalmente gli strumenti a quadrupolo risolvono facilmente ioni che differiscono di una sola unità di massa.

1.5.7. Il rivelatore

Il rivelatore è costituito da un *tubo fotomoltiplicatore* (EM, *Electron Multiplier*), rappresentato schematicamente in *Figura 6*.

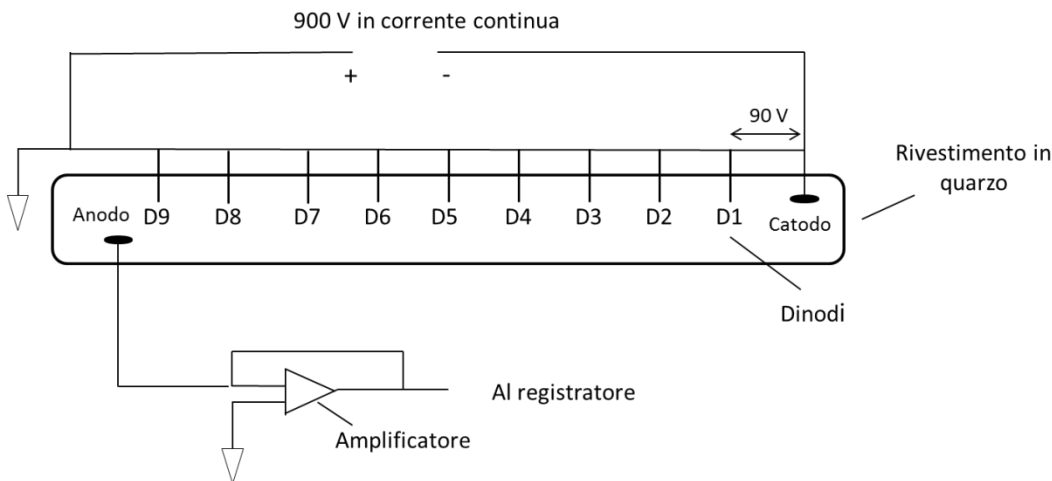


Figura 6: Schema di un tubo fotomoltiplicatore

Oltre al catodo e all'anodo sono presenti diversi elettrodi addizionali (*dinodi*, in *Figura 6* ne sono mostrati nove). Il dinodo D1 è mantenuto ad un potenziale di 90 V più positivo rispetto al catodo, e di conseguenza gli elettroni sono accelerati verso di esso. Quando uno ione entra nel tubo fotomoltiplicatore urta il primo dinodo causando l'emissione di elettroni. Questi ultimi urtano quindi il dinodo successivo generando sempre più elettroni. Ripetendo questo processo si ottengono milioni di elettroni per ogni ione; gli elettroni sono raccolti all'anodo e la corrente risultante è quindi convertita in tensione e misurata.

Questo tipo di rivelatori presenta dei tempi di risposta molto brevi. Spesso la sensibilità di uno strumento con un fotomoltiplicatore è limitata dalla sua emissione di corrente oscura. Poiché l'emissione termica è la sorgente principale degli elettroni di corrente oscura, le prestazioni di un fotomoltiplicatore possono essere migliorate con il raffreddamento.

1.5.8. Interferenze spettroscopiche

Uno dei vantaggi dell'utilizzo della spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente rispetto alla rivelazione ottica è che gli spettri di massa sono generalmente molto più semplici e facili da interpretare rispetto a quelli ottici; resta però il problema delle *interferenze spettroscopiche*.

Le interferenze spettroscopiche si verificano quando una specie ionica nel plasma ha lo stesso valore m/z di uno ione dell'analita. Tali interferenze rientrano in quattro categorie:

1. *Ioni isobarici*: le specie isobariche sono due elementi i cui isotopi hanno la stessa massa. Poiché le sovrapposizioni isobariche sono prevedibili con certezza dalle tabelle di abbondanza, le correzioni possono essere eseguite utilizzando un software opportuno.
2. *Interferenze di ioni poliatomici*: tale interferenza si verifica quando dalle interazioni tra le specie presenti nel plasma e quelle nella matrice si formano delle specie poliatomiche. Queste specie possono pertanto produrre alcuni ioni molecolari aventi lo stesso valore di m/z di ioni atomici. Tali ioni sono rimossi nella cella di collisione mediante l'utilizzo di un *gas collisionale* (He). La funzione del gas collisionale è quella di provocare collisioni e reazioni in grado di distruggere gli ioni poliatomici presenti nel plasma.
3. *Interferenze dovute a ossidi e idrossidi*: l'interferenza più seria che si può avere nell'ICP-MS è quella dovuta agli ossidi e idrossidi che si formano dallo stesso analita, dai componenti della matrice, dal solvente e dai gas del plasma. La formazione degli ossidi dipende da alcune variabili sperimentali, quali la velocità del flusso d'iniezione, la potenza delle radiofrequenze, le dimensioni dell'orifizio per il campione, la composizione del gas del plasma, l'eliminazione dell'ossigeno e l'efficienza di rimozione del solvente; tutte queste variabili possono essere regolate in funzione dello specifico problema di sovrapposizione dei segnali di ossidi e idrossidi.
4. *Ioni a doppia carica*: sono specie che si formano quando uno ione viene generato con una carica doppiamente positiva contrariamente alla normale formazione di ioni a singola carica; gli ioni a doppia carica producono picchi a valori pari alla metà della massa. Analogamente alla formazione degli ossidi, il livello di formazione degli ioni a doppia carica è legato alle condizioni di ionizzazione nel plasma e può essere generalmente minimizzato attraverso un'attenta ottimizzazione del flusso di gas del nebulizzatore, della potenza della radiofrequenza e la posizione del campione dentro il plasma.

1.5.9. *Analisi quantitativa con l'ICP-MS*

Il metodo di analisi quantitativa più utilizzato nella tecnica ICP-MS sfrutta una serie di standard di calibrazione per ottenere la curva di calibrazione (metodo della calibrazione esterna). Per compensare la deriva dello strumento e l'instabilità viene solitamente analizzato anche uno standard interno, cioè un elemento assente nei campioni e che presenta una massa atomica e un potenziale di ionizzazione simili a quelli dell'analita. Nelle analisi condotte in questa tesi gli standard interni utilizzati sono ^6Li , ^{45}Sc , ^{72}Ge , ^{103}Rh , ^{115}In , ^{159}Tb , ^{175}Lu e ^{209}Bi .

1.6. La digestione umida con riscaldamento a microonde

La digestione umida è una tecnica di pretrattamento molto utilizzata per la determinazione di specie inorganiche; non è invece adatta per la determinazione di specie organiche che subiscono degradazione chimica e termica. Il processo di digestione avviene all'interno di un contenitore nel quale sono introdotti il campione e i reattivi di solubilizzazione, eventualmente coadiuvati da reattivi di ossidazione. Generalmente sono utilizzati acidi puri o in miscela; nel nostro studio è stato utilizzato HNO_3 concentrato perché non aggiunge ulteriori specie interferenti in ICP-MS in quanto H, N e O sono elementi non determinabili. La digestione è stata eseguita in sistema chiuso; in tal modo è possibile raggiungere temperature superiori a quelle di ebollizione degli acidi a temperatura ambiente, con aumento delle proprietà solubilizzanti e ossidanti dei reagenti impiegati. Inoltre il sistema chiuso limita le perdite di campione per volatilizzazione.

Come metodo di riscaldamento sono spesso utilizzate le microonde. La preparazione a microonde del campione è una tecnica molto utilizzata per analisi elementari mediante ICP-MS ed è stata adottata anche nel presente lavoro. L'energia associata alle microonde (600-1500 W nelle apparecchiature da laboratorio) non è in grado di rompere direttamente i legami molecolari, ma può essere assorbita da sostanze come l'acqua e gli acidi minerali, che in questo modo si scaldano rapidamente e, in un sistema chiuso, sono in grado di solubilizzare il campione in maniera più efficiente e in tempi minori rispetto alla semplice digestione acida. Con questo sistema di digestione si ottiene una soluzione limpida contenente gli analiti di interesse.

1.7. L'analisi elementare

La determinazione di carbonio, idrogeno, zolfo e azoto è eseguita mediante analisi elementare, nella quale viene utilizzata la tecnica di *combustione dinamica rapida (dynamic flash combustion)*. Il campione è inizialmente pesato e sigillato in una capsula di stagno. L'analizzatore è mantenuto sotto un flusso di gas He pretrattato per rimuovere le tracce di O₂, H₂O e CO₂. All'inizio dell'analisi viene aggiunto al flusso di He un eccesso noto di O₂; la capsula viene poi lasciata cadere in un crogiolo di ceramica preriscaldato, dove fonde lasciando ossidare il campione. I prodotti passano quindi attraverso un catalizzatore che rende il processo di ossidazione quantitativo. La miscela risultante comprende CO₂, N₂, H₂O e SO₂ e viene separata per gas cromatografia; ciascun componente viene misurato per mezzo di un rivelatore a conducibilità termica [56].

1.8. Gli strumenti statistici

1.8.1. Calcolo del Limite di Rivelabilità e Quantificazione

Per *Limite di Rivelabilità (LdR)* si intende la concentrazione di analita che produce un segnale *significativamente* diverso da quello del bianco, ovvero la concentrazione corrispondente al minimo segnale significativo. La definizione di limite di rivelabilità dipende dal criterio usato per accertarsi che il segnale sia significativamente diverso da quello del bianco.

Nel nostro caso è stata utilizzata la procedura EPA che prevede il calcolo del *LdR* considerando 4 punti della retta di calibrazione per i quali il segnale risulta proporzionale alla minima concentrazione e utilizzando la formula:

$$LdR_{strumentale} = \frac{A \cdot s_{y/x}}{b}$$

dove:

b = pendenza della retta di calibrazione

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - a - bx_i)^2}{n - 2}}$$

$$A = t_{\alpha, \nu} \quad \nu = n - 1$$

Per Limite di Quantificazione (LdQ) si intende invece la concentrazione minima di analita che può essere quantificata con un determinato metodo d'analisi.

Viene calcolato mediante la formula:

$$LdQ_{strumentale} = 3 \cdot LdR_{strumentale}$$

I limiti di rivelabilità e quantificazione così calcolati non considerano d'altronde la procedura sperimentale utilizzata per la preparazione dei campioni, ma solamente il limite strumentale. Per tener conto della procedura è necessario rapportare la concentrazione calcolata alla massa del campione pesato, secondo le formule:

$$LdR_{procedura} = \frac{LdR_{strumentale} \cdot V_{soluzione}}{massa\ campione}$$

$$LdQ_{procedura} = \frac{LdQ_{strumentale} \cdot V_{soluzione}}{massa\ campione}$$

1.8.2. Test statistici

Una procedura statistica molto utilizzata è il test (test statistico), che ha lo scopo di confrontare due o più valori tra loro, per determinare se essi siano statisticamente equivalenti o meno. Sono disponibili numerosissimi test statistici, che si differenziano in base al tipo di confronto che si vuole/deve fare, alla dipendenza od indipendenza dei valori da confrontare, ed al tipo di distribuzione attesa. Nei paragrafi seguenti sono descritti i test statistici utilizzati in questo lavoro di tesi.

1.8.3. Confronto di dati appaiati (dipendenti)

Questo test viene utilizzato quando i dati sperimentali non sono tutti indipendenti tra loro, ma risultano associabili a due a due secondo un certo vincolo. In questo caso è preferibile sottoporre a test le singole differenze anziché confrontare globalmente le serie separate.

Questo test prevede il calcolo del coefficiente T di Student, mediante la formula:

$$T = \frac{\bar{D} \cdot \sqrt{n}}{s_D} \sim t_{\alpha, \nu}$$

dove:

n = numero di coppie di dati

$$\bar{D} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n D_j$$

$$D_j = X_j - Y_j$$

$$s_D = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (D_j - \bar{D})^2}$$

Si procede quindi al confronto del valore T calcolato col dato tabulato $t_{\alpha, \nu}$ ($\nu = n - 1$).

Se risulta $T > t_{\alpha, \nu}$ si accetta l'ipotesi che, a livello di probabilità di test, sussista una significativa differenza tra le due serie di misure. In caso contrario la differenza riscontrata è puramente casuale.

1.8.4. Test di Wilcoxon Mann Whitney della somma dei ranghi

Il test di Wilcoxon Mann Whitney della somma dei ranghi permette il confronto delle mediane di due set di dati. Appartiene alla classe dei metodi non parametrici per campioni indipendenti ed è adatto quando i dati dei due gruppi sono indipendenti e la distribuzione non è nota.

Questo metodo prevede di combinare i dati in una serie unica attribuendo il rango ad ogni valore tenendo traccia della serie di appartenenza; si calcolano quindi T (somma dei ranghi del gruppo con dimensione minore) e μ_T (media attesa) mediante le formule:

$$T = \sum_{j=1}^n R_j$$

$$\mu_T = \frac{n_1 \cdot (n_1 + n_2 + 1)}{2}$$

in cui n_1 e n_2 rappresentano rispettivamente le dimensioni del gruppo minore e quelle del gruppo maggiore. La significatività della differenza tra le mediane dei due gruppi è valutata confrontando il valore di media attesa μ_T con il valore T calcolato.

Nel caso di campioni con numerosità elevate la statistica T segue una distribuzione approssimativamente normale per cui la significatività può essere saggiata mediante la distribuzione normale ridotta, con media 0 e varianza 1. Inoltre è conveniente applicare la correzione per la continuità, sommando ± 0.5 al valore di T , in modo che lo scarto tra osservato e atteso sia il più piccolo. In tal caso si procede al calcolo di Z mediante la formula:

$$Z = \frac{(T \pm 0.5) - \mu_T}{\sigma_T}$$

dove T e μ_T rappresentano rispettivamente la somma dei ranghi del gruppo con dimensione minore e la media attesa precedentemente definite, mentre σ_T viene calcolato con la formula:

$$\sigma_T = \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2 \cdot (n_1 + n_2 + 1)}{12}}$$

Infine si confronta il valore di Z ottenuto con il valore di Z_α riportato nelle tabelle della distribuzione normale standardizzata. Se risulta $Z > Z_\alpha$ si accetta l'ipotesi che esista una significativa differenza tra le due mediane. In caso contrario la differenza non è significativa.

1.8.5. *F-test*

L'*F-test* permette di confrontare le varianze di due set di dati, s_A^2 e s_B^2 . Il valore critico di F viene calcolato con la formula:

$$F = \frac{s_A^2}{s_B^2} \quad \text{per } s_A^2 > s_B^2$$

e confrontato con il valore critico tabulato F_{α, v_1, v_2} dove $v_1 = n_1 - 1$ e $v_2 = n_2 - 1$.

Se risulta $F > F_{\alpha, v_1, v_2}$ si conclude che i due set di dati hanno varianza significativamente diversa; in caso contrario la differenza non è significativa.

1.8.6. *t-test di Student*

Questo test appartiene alla classe dei metodi parametrici per campioni indipendenti e permette di confrontare le medie provenienti da due set diversi di dati. È previsto il confronto del valore T di Student calcolato con quello critico riportato nelle tabelle.

Se l'*F-test* risulta positivo (varianze dei due set di dati significativamente diverse) il valore di T viene calcolato con la formula:

$$T = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

e confrontato con il valore critico $t_{\alpha, v}$ in cui

$$v = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1-1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2-1}}$$

dove \bar{x}_1 e \bar{x}_2 sono le medie dei due set di dati, n_1 e n_2 le dimensioni dei due gruppi e S_1^2 e S_2^2 le rispettive varianze.

Se invece l' F -test risulta negativo (varianze dei due set di dati uguali) il valore di T viene calcolato con la formula:

$$T = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_P \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$\text{dove } S_P = \sqrt{\frac{(n_1-1) \cdot S_1^2 + (n_2-1) \cdot S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

e confrontato con il valore critico $t_{\alpha, v}$ in cui $v = n_1 + n_2 - 2$.

Analogamente agli altri test, se il valore calcolato risulta maggiore di quello critico si conclude che i due set di dati hanno media significativamente diversa; in caso contrario la differenza non è significativa.

1.8.7. Analisi delle componenti principali (PCA)

L'Analisi delle Componenti Principali è una tecnica di analisi utilizzata per rappresentare i dati quando questi sono descritti da molte variabili. Con questo metodo è possibile rappresentare l'insieme di dati con un nuovo set di variabili ortogonali tra loro, definite *Componenti Principali (PCs)*, generate dalla combinazione lineare delle variabili originali [54]. Le PCs vengono calcolate gerarchicamente; la prima PC rappresenta la combinazione per al quale si ha il massimo di variabilità, mentre la seconda è la combinazione, ortogonale alla prima, che rappresenta il massimo della variabilità residua e così successivamente per tutte le altre. In questo modo il rumore sperimentale e le variazioni random sono contenute nelle ultime PCs. L'utilizzo di un ristretto numero di PCs significative permette così un'effettiva diminuzione della dimensionalità dei dati.

La PCA è utilizzata per:

- valutare le correlazioni tra le variabili e la loro rilevanza
- visualizzare gli oggetti (individuazione di outliers, di classi, ecc...)

- sintetizzare la descrizione dei dati (eliminazione di rumore o informazione spuria)
- ridurre la dimensionalità dei dati
- ricercare proprietà principali
- definire un modello di rappresentazione dei dati in uno spazio ortogonale [57]

2. Parte sperimentale

2.1. Reagenti

Per la preparazione dei campioni sono stati utilizzati:

- HNO₃ 69 %p/p, "ARISTAR" for trace analysis (codice prodotto 450042N, batch K44055045 248);
- acqua MilliQ

Per la calibrazione dello strumento sono stati utilizzati gli standard multielemento:

- CLPP-CAL-1, "INORGANIC VENTURES" (indicato con CLPP), contenente Ca, K, Mg, Na in concentrazione 5000 µg/mL, Al, Ba 2000 µg/mL, Fe 1000 µg/mL, Co, Mn, Ni, V, Zn 500 µg/mL, Ag, Cu 250 µg/mL, Cr³⁺ 200 µg/mL, Be 50 µg/mL, in matrice di HNO₃ 5% (v/v), densità 1.116 g/mL, numero lotto E2-MEB399058
- CCS-5, "INORGANIC VENTURES" (indicato con CCS), contenente B, Ge, Hf, Mo, Nb, P, Re, S, Sb, Si, Sn, Ta, Ti, W, Zr in concentrazione 100 µg/mL, in matrice di HF 1.0 % (v/v) e HNO₃ 7.14 % (v/v), densità 1.043 g/mL, numero lotto E2-MEB348076
- IV-ICPMS-71A, "INORGANIC VENTURES" (indicato con IV), contenente Ag, Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Ce, Co, Cr³⁺, Cs, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Ga, Gd, Ho, K, La, Lu, Mg, Mn, Na, Nd, Ni, P, Pb, Pr, Rb, S, Se, Sm, Sr, Th, Tl, Tm, U, V, Yb, Zn in concentrazione 10 µg/mL, in matrice di HNO₃ 3.0 % (v/v), densità 1.016 g/mL, numero lotto F2-MEB419012 e G2-MEB463152
- Agilent Technologies Multielement Calibration Standard 4 (indicato con Ag 4), contenente B, Ge, Mo, Nb, P, Re, S, Si, Ta, Ti, W, Zr, Sr in concentrazione 10 µg/mL, in matrice di H₂O, tracce di HF e HNO₃, numero lotto 1-226 YB
- Agilent Technologies Multielement Calibration Standard 3 (indicato con Ag 3), contenente Au, Hf, Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Sn, Te in concentrazione 10 µg/mL, in matrice di HCl 10%, HNO₃ 1%, numero lotto 6-102 YPY2
- Agilent Technologies Multielement Calibration Standard 1 (indicato con Ag 1), contenente Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sc, Sm, Tb, Th, Tm, Y, Yb in concentrazione 10 µg/mL, in matrice di HNO₃ 5%, numero lotto 3-121 YP

2.2. Campionamento

I campioni di placenta sono stati prelevati nella zona attorno al cordone ombelicale. Sono stati sezionati campioni di circa 5 cm², conservati congelati a -18°C in fogli di alluminio fino al momento dell'analisi.

Dalle donne donatrici sono state acquisite informazioni riguardo i seguenti parametri: età, indice di massa corporea (BMI) prima della gravidanza, valore della glicemia a digiuno, percentuale di HbA1c, settimana alla quale è stato diagnosticato il GDM (nelle donne che lo hanno sviluppato in gravidanza), settimane totali di gestazione e peso del bambino alla nascita. In *Tabella 4* sono riportati i parametri clinici e metabolici delle donne incinta sotto studio (i dati sono espressi come media ± deviazione standard).

Tabella 4: Parametri clinici e metabolici delle donne incinta sotto studio

	GDM	Controllo
Età (anni)	33.7 ± 5.0	33.6 ± 4.9
BMI pregravidico (kg/m ²)	24.5 ± 4.0	23.0 ± 4.0*
Settimana gestazionale alla quale è stato diagnosticato il GDM	24.0 ± 4.0	-
Settimane di gestazione	37.9 ± 1.6	39.0 ± 1.0
Glicemia a digiuno (mmol/L)	4.90 ± 0.63	4.20 ± 0.18*
HbA1c (%)	5.44 ± 0.32	5.00 ± 0.20*
Peso del bambino (g)	3222 ± 613	3292 ± 504

*p<0.05 vs GDM

Inoltre sono state acquisite informazioni su residenza, fumo, uso di farmaci, data del parto, gravidanze e/o aborti avuti precedentemente ed eventuali complicanze riscontrate durante la gravidanza.

2.3. Preparazione dei campioni

Al momento dell'analisi ogni campione congelato è stato suddiviso in parte materna e fetale, utilizzando bisturi e pinzette. Per ogni lato sono stati tagliati campioni di 1 g circa, posti in tubi di plastica successivamente coperti con parafilm. I campioni di placenta sono stati quindi liofilizzati, inserendo i tubi in un liofilizzatore per 24 ore. La liofilizzazione comporta una diminuzione di peso mediamente pari al 90%.

All'inizio della liofilizzazione il vuoto repentino potrebbe causare l'ebollizione dell'acqua e la fuoriuscita dei campioni dai tubi, per cui è stato necessario porre particolare attenzione nel

portare il sistema sotto pressione. Terminata la liofilizzazione i campioni sono stati conservati negli stessi tubi di plastica a temperatura ambiente.

Per la preparazione delle soluzioni campione sono state utilizzate delle fiale di pirex da 35 mL con tappo in gomma e dotate di ancoretta magnetica. I campioni di placenta sono stati pesati esattamente nelle fiale ed è stato aggiunto HNO₃ al 69 % p/p.

2.4. Digestione microonde

Le singole fiale chiuse con tappo sono state quindi inserite nel reattore a microonde; lo strumento disponibile è costituito da:

- Campionatore automatico da 48 postazioni
- Cavità d'introduzione delle fiale portacampioni con generatore di campo magnetico a microonde (potenza 300W)
- Agitazione elettromagnetica a velocità variabile

Ogni campione viene processato singolarmente, con l'energia delle microonde direttamente applicata allo stesso e controllata con precisione grazie al monitoraggio continuo della pressione e della temperatura del contenitore.

In particolare la tecnologia brevettata *ActiVentTM* permette un controllo automatizzato delle pressioni attraverso un sistema di rimozione dei gas prodotti dalla digestione senza la perdita delle eventuali sostanze volatili presenti nel campione, mentre il sistema *PowerMax* consente il simultaneo e rapido raffreddamento post digestione [58].

Durante la digestione a microonde la temperatura massima è di 200 °C raggiunta in 4 min e mantenuta tale per 2 min, la pressione massima è di 400 psi e la potenza è di 300 W. Durante il processo il campione viene mescolato con ancoretta magnetica e la provetta viene fatta sfiatare 5 volte. In *Tabella 5 e 6* sono riportati i parametri di utilizzo del reattore a microonde.

Tabella 5: Parametri di utilizzo del reattore a microonde Discover SP-D CEM

Temperatura massima (°C)	200
Tempo rampa (min)	4:00
Tempo sosta (min)	2:00
Pressione max (psi)	400
Potenza (W)	300
Velocità di mescolamento	medio
Numero di sfiati	5

Tabella 6: Programma di pressione e sfiati per il metodo utilizzato

Intervalli	Pressione (psi) degli sfiati	Numero massimo di sfiati
1	225	2
2	250	2
3	275	2
4	300	2
5	350	100

In Figura 7 sono riportati i profili di Pressione (psi), Temperatura (°C) e Potenza (W) caratteristici del metodo.

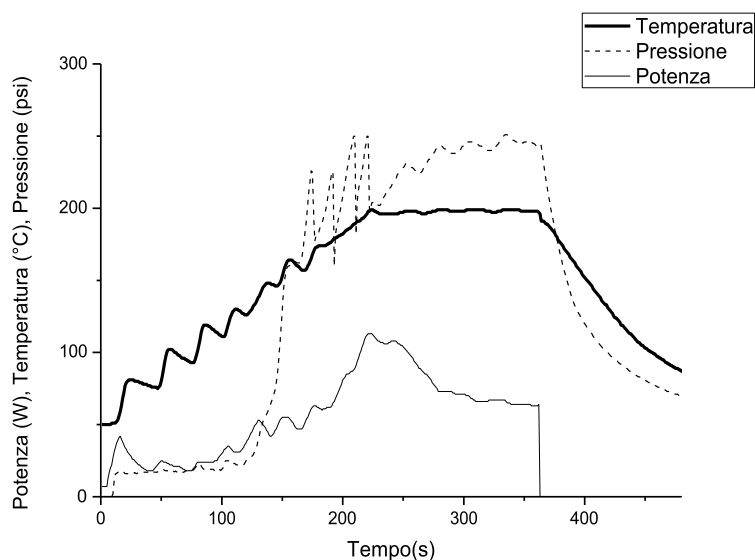


Figura 7: Profili di Temperatura (°C), Pressione (psi) e Potenza (W) di una digestione a microonde di un campione di 200 mg in 3 mL di HNO₃ concentrato in una fiala da 35 mL

I campioni digeriti sono stati infine diluiti con acqua MilliQ per ottenere delle soluzioni acide al 4 % p/p circa, adatte per essere analizzate con l'ICP-MS.

2.5. Procedura di calibrazione

Per la calibrazione dello strumento sono stati utilizzati gli standard multielemento sopraelencati. Per ogni standard, a partire dalla soluzione madre, sono state preparate una decina di soluzioni a concentrazione decrescente, utilizzando una soluzione di HNO₃ 4% p/p per portare a volume.

2.6. Parametri operativi dell'ICP-MS

In *Tabella 7* sono riportati i parametri caratteristici dello strumento *ICP-MS* utilizzato per questo studio.

Tabella 7: Parametri di utilizzo dell'ICP-MS Agilent 7700x [55]

Strumento	Agilent 7700x ICP-MS
Potenza radiofrequenza	1550 W
RF matching	1.8 V
Flusso del gas al plasma	15 L/min Ar
Flusso del gas carrier	1.05 L/min Ar
Flusso gas He	4.3 mL/min
CeO ⁺ /Ce ⁺	0.90%
Nebulizzatore	Microflow PFA nebuliser
Camera spray	Scott double-pass type at 2 °C
Torcia	Torcia al quarzo
Velocità d'introduzione del campione	0.1 mL/min
Cono campionatore di nichel	1.0 mm diametro interno
Cono scrematore	0.5 mm diametro interno
Profondità di campionamento	8.5 mm
Modalità detector	Dual (conteggio analogico e digitale)
Dwell time/mass	100

2.7. L'analisi elementare

L'analisi elementare eseguita su un campione di placenta di prova riporta le seguenti percentuali di C, H, N e S: C: 47.06%, H: 7.25%, N: 12.79%, S: 0.58%.

2.8. Le calibrazioni

Di seguito sono riportati i parametri di una delle calibrazioni utilizzate per la determinazione della concentrazione degli elementi nei campioni. In *Tabella 8* per ogni elemento sono riportati lo standard utilizzato, l'intervallo di regressione, l'intercetta, la pendenza, il coefficiente di regressione e il limite di rivelabilità strumentale ottenuto.

Tabella 8: Parametri delle rette di calibrazione $y=a+bx$ per i diversi elementi: intervallo di regressione (Δx), intercetta ($a(s_a)$), pendenza ($b(s_b)$), coefficiente di regressione (R^2) e limite di rivelabilità strumentale ($LdR_{strum.}$)

Elem.	Std.	Δx (ppb)	$a(s_a)$	$b(s_b)$	R^2	$LdR_{strum.}$ (ppb)
Na	CLPP	10000-500000	$8(5) \cdot 10^6$	$2.82(0.02) \cdot 10^3$	0.99990	9.5
Mg	CLPP	750-5000	$1.0(0.2) \cdot 10^5$	$1.540(0.005) \cdot 10^3$	0.99995	22
Al	IV	2-250	$3(1) \cdot 10^3$	$7.40(0.08) \cdot 10^2$	0.9995	3.8
P	CCS	1000-5000	$2(1) \cdot 10^3$	$4.97(0.02) \cdot 10^1$	0.99995	1.7
K	CLPP	10000-500000	$5(3) \cdot 10^6$	$1.77(0.01) \cdot 10^3$	0.99990	3.5
Ca	CLPP	1000-500000	$1.4(0.3) \cdot 10^3$	$5.88(0.02)$	0.99997	51
Ti	Ag4	1-10	$1(1) \cdot 10^2$	$7.7(0.2) \cdot 10^2$	0.997	0.054
V	IV	0.01-1	$5.5(0.6) \cdot 10^2$	$2.42(0.01) \cdot 10^4$	0.99990	0.016
Cr	IV	0.05-2	$3.7(0.2) \cdot 10^3$	$30.0(0.2) \cdot 10^3$	0.9998	0.031
Mn	IV	0.2-20	$3(1) \cdot 10^3$	$17.7(0.1) \cdot 10^3$	0.99990	0.066
Fe	CLPP	150-2000	$3(7) \cdot 10^5$	$2.206(0.007) \cdot 10^4$	0.99996	1.0
Co	IV	0.01-0.2	$2.1(0.2) \cdot 10^3$	$4.3(0.2) \cdot 10^4$	0.990	0.022
Ni	IV	0.2-20	$2.6(0.1) \cdot 10^4$	$1.21(0.01) \cdot 10^4$	0.9990	0.52
Cu	IV	2-250	$6(3) \cdot 10^4$	$2.97(0.03) \cdot 10^4$	0.9997	0.22
Zn	CLPP	100-5000	$1.6(0.7) \cdot 10^4$	$4.40(0.03) \cdot 10^3$	0.9998	0.33
Ga	IV	0.01-1	$1.4(0.2) \cdot 10^3$	$1.67(0.03) \cdot 10^4$	0.998	0.060
As	IV	0.01-1	$5.0(0.4) \cdot 10^1$	$3.870(0.008) \cdot 10^3$	0.99998	0.0064
Se	IV	0.2-20	$2.0(0.2) \cdot 10^2$	$4.59(0.02) \cdot 10^2$	0.99990	0.072
Rb	IV	20-250	$3(3) \cdot 10^4$	$1.82(0.02) \cdot 10^4$	0.9997	0.024
Sr	IV	0.2-20	$4(1) \cdot 10^3$	$2.50(0.01) \cdot 10^4$	0.99990	0.061
Zr	Ag4	0.025-2	$-1(4) \cdot 10^2$	$3.86(0.04) \cdot 10^4$	0.9996	0.015

Nb	Ag4	0.05-4	$9(4) \cdot 10^2$	$7.87(0.02) \cdot 10^4$	0.99998	0.0056
Mo	Ag4	0.025-1	$7.8(0.5) \cdot 10^2$	$1.72(0.01) \cdot 10^4$	0.99991	0.015
Cd	IV	0.05-2	$-2(2) \cdot 10^1$	$8.52(0.03) \cdot 10^3$	0.99997	0.015
Sn	CCS	0.05-5	$1.03(0.02) \cdot 10^3$	$1.8780(0.0005) \cdot 10^4$	0.99996	0.10
Sb	CCS	0.05-5	$2(2) \cdot 10^2$	$2.288(0.005) \cdot 10^4$	0.99997	25
Cs	IV	0.05-2	$-4(1) \cdot 10^2$	$5.46(0.01) \cdot 10^4$	0.99998	0.0095
Ba	IV	0.05-2	$4.3(0.7) \cdot 10^3$	$1.43(0.07) \cdot 10^4$	0.9892	0.28
La	IV	0.01-0.1	$-1(4) \cdot 10^2$	$1.07(0.06) \cdot 10^5$	0.993	0.011
Ce	IV	0.01-0.1	$-2(7) \cdot 10^2$	$1.2(0.1) \cdot 10^5$	0.985	0.013
Gd	IV	0.01-1	$-3(6) \cdot 10^1$	$3.07(0.01) \cdot 10^4$	0.99994	0.012
Pb	IV	0.05-2	$2.0(5) \cdot 10^4$	$1.43(0.05) \cdot 10^5$	0.996	0.078

2.9. Metodo di analisi

Per la messa appunto del metodo sono state eseguite 2 analisi utilizzando una placenta di prova. Nella prima prova sono stati pesati esattamente ca. 50 mg di campione nelle fiale di pirex e aggiunti 4 g di HNO₃ 69%. Dopo la digestione microonde il contenuto delle fiale è stato portato a volume a 100 mL in un matraccio con acqua MilliQ. In *Tabella 9* sono riportati i dati relativi alla preparazione di questi campioni.

Tabella 9: Prima analisi di prova: preparazione dei campioni

Campione	Peso campione (mg)	Peso totale (g)
1	58.36	101.44
2	63.98	101.62
3	43.52	101.58
4	43.71	101.25
5	48.32	101.26

Per la seconda prova sono stati preparati 3 campioni pesando in una fiala di pirex esattamente ca. 200 mg di campione della stessa placenta di prova utilizzata nella prima analisi; ad essa sono stati aggiunti ca. 3 g di HNO₃ 69 %. Dalla differenza di peso della fiala prima e dopo la digestione è stata valutata la perdita di acido nitrico durante la digestione stessa e quindi la quantità di acido effettivamente aggiunta. Il contenuto della fiala è stato trasferito in un matraccio di vetro, portando a volume con acqua MilliQ in modo tale che l'acido rappresenti circa il 4% p/p del campione finale. In *Tabella 10* sono riportati i dati relativi alla preparazione dei campioni.

Tabella 10: Seconda analisi di prova: preparazione dei campioni

Campione	Peso campione (mg)	Peso totale (g)
1	186.4	50.02
2	192.5	39.33
3	191.5	40.65

I campioni sono stati infine trasferiti in fiale di plastica da 15 mL per essere analizzati con l'ICP-MS.

In entrambe le analisi è stato inoltre preparato un campione di bianco processo, ossia una fiala contenente solo 4 g HNO₃ 69% che viene sottoposta allo stesso processo di digestione e diluizione delle soluzioni campione.

In *Tabella 11*, per ogni elemento, sono riportati i limiti di rivelabilità della procedura ($LdR_{procedura}$) ottenuti nelle due analisi di prova.

Tabella 11: Limiti di rivelabilità ottenuti nelle due analisi di prova

Elemento	$LdR_{procedura}$ (ppm)	
	Analisi di prova 1	Analisi di prova 2
Na	13	10
Mg	1.8	1.3
Al		1.1
P	41	17
K	7.7	1.1
Ca		7.4
Ti		0.071
V		0.043
Cr	0.029	0.24
Mn	0.057	0.013
Fe	3.0	2.2
Co		0.025
Cu	0.21	0.070
Zn	1.9	2.3
Se		0.075
Rb	0.080	0.054
Sr		0.15
Zr	0.77	0.047
Cd	0.062	0.057
Sn	0.25	0.035
Sb		0.12
Cs		0.060
Pb		0.025

2.10. Prova di recupero

Per questa prova sono stati preparati 5 campioni per determinare la percentuale di recupero di alcuni elementi, aggiungendo, oltre al campione, una quantità di standard tale che la massa dell'elemento di cui si vuole sapere la percentuale di recupero nel campione e nello standard siano simili.

Analogamente alle analisi di prova, anche in questo caso i campioni sono stati sottoposti a digestione, diluiti con acqua MilliQ e trasferiti nelle fiale da 15 mL per essere analizzati, ed è stato preparato un campione di bianco processo. In *Tabella 12* sono riportati i dati relativi alla preparazione dei campioni.

Tabella 12: Preparazione dei campioni per la prova di recupero

Campione	Peso campione (mg)	Peso totale (g)	PROVA DI RECUPERO			
			Standard aggiunto	Elemento	Conc. (ppb)	Massa aggiunta (µg)
1	211.4	38.86	IV	Cr	1,6	0.06083
2	190.2	34.76	IV	Cu, Zn, Rb	110	3.887
3	204.6	43.94	CLPP	Mg	1300	58.13
				Fe	260	11.63
4	215.9	37.02	CLPP	Na, K	52000	1932
5	195.4	35.69	CCS	P	2800	98.59

In Tabella 13 vengono riportati i risultati della prova di recupero.

Tabella 13: Percentuale di recupero ottenuta per i diversi elementi

Elem.	Std. aggiunto	Massa aggiunta (µg)	%Rec.	Elem.	Std. aggiunto	Massa aggiunta (µg)	%Rec.
Be	IV	3.887	98	Sb	CCS	98.59	104
Na	CLPP	1932	99	Cs	IV	0.06083	100
Mg	CLPP	1932	99	Ba	IV	3.887	98
Al	CLPP	772.8	102	La	IV	3.887	100
P	CCS	98.59	390	Ce	IV	3.887	100
K	CLPP	1932	121	Pr	IV	3.887	100
Ca	CLPP	1932	109	Nd	IV	3.887	102
Ti	CCS	98.59	74	Sm	IV	3.887	102
V	IV	0.06083	97	Eu	IV	3.887	101
Cr	IV	0.06083	96	Gd	IV	3.887	99
Mn	IV	3.887	100	Dy	IV	3.887	100
Fe	CLPP	386.4	102	Ho	IV	3.887	100
Co	IV	0.06083	100	Er	IV	3.887	100
Ni	IV	3.887	103	Tm	IV	3.887	100
Cu	IV	3.887	113	Yb	IV	3.887	99
Zn	IV	3.887	110	Hf	CCS	98.59	109
Se	IV	3.887	113	Ta	CCS	98.59	105
Rb	IV	3.887	114	W	CCS	98.59	104
Sr	IV	3.887	100	Re	CCS	98.59	106
Zr	CCS	98.59	102	Tl	IV	3.887	93
Nb	CCS	98.59	104	Pb	IV	3.887	90
Mo	CCS	98.59	102	Th	IV	3.887	98
Cd	IV	0.06083	15	U	IV	3.887	97
Sn	CCS	98.59	101				

2.11. Analisi dei campioni di placenta

Sono stati analizzati 47 campioni di placenta, e per ognuno di questi è stato analizzato sia il lato materno che fetale. I campioni sono stati preparati secondo la procedura utilizzata in *Analisi di prova 2*, metodo che consente di ottenere il limite di rivelabilità migliore. Per ogni campione è stata determinata la concentrazione di tutti gli elementi presenti, e sono stati eseguiti i seguenti test:

- *Confronto di dati appaiati (dipendenti)*, per confrontare le concentrazioni tra lato materno e fetale
- *Test di Wilcoxon Mann Whitney della somma dei ranghi e t-test di Student* per il confronto tra la concentrazione degli elementi nelle donne sane e nelle donne con GDM

Per la determinazione delle concentrazioni degli elementi nei singoli campioni le operazioni eseguite sono:

- eliminare i segnali paragonabili con il segnale del bianco
- determinare la concentrazione dei diversi elementi nel campione per interpolazione della retta di calibrazione, considerando i punti della retta contenenti il segnale del campione in esame
- sottrarre il valore del bianco processo alla concentrazione del campione
- calcolare il limite di rivelabilità nel campione ed escludere le concentrazioni inferiori

Per la determinazione dell'errore strumentale è stato preparato un campione e la soluzione ottenuta è stata suddivisa in 5 fiale da 15 mL. Per ottenere invece l'errore associato alla procedura sono stati preparati 5 diversi campioni della stessa placenta omogeneizzata. Infine, preparando 5 diversi campioni della stessa placenta si ottiene l'errore associato al campionamento e alla procedura.

2.11.1. Presenza degli elementi e concentrazioni

In *Tabella 14* e *Tabella 15* sono mostrati i risultati ottenuti nelle 5 analisi. La *Tabella 14* evidenzia, mediante una scala cromatica, la percentuale con la quale un certo elemento è risultato presente in ognuna delle analisi, cioè la percentuale di volte in cui la sua concentrazione è risultata maggiore del limite di rivelabilità e del segnale del bianco. La *Tabella 15* riporta, per ogni elemento, l'intervallo di concentrazione, la media, la mediana, l'errore strumentale, l'errore associato alla procedura e quello relativo al campionamento e alla procedura.

Tabella 14: Percentuale di presenza degli elementi nelle 5 analisi dei 47 campioni di placenta

Elemento	Analisi				
	1	2	3	4	5
Na	■	■	■	■	■
Mg	■	■	■	■	■
Al	■	■	■	■	■
P	■	■	■	■	■
K	■	■	■	■	■
Ca	■	■	■	■	■
Ti	□	■	■	■	■
V	■	■	■	■	□
Cr	■	■	■	■	■
Mn	□	■	■	■	■
Fe	■	■	■	■	■
Co	■	■	■	■	■
Ni	■	■	□	□	□
Cu	■	■	■	■	■
Zn	■	■	■	■	■
Ga	□	■	■	■	■
As	■	■	■	■	□
Se	■	■	■	■	■
Rb	■	■	■	■	■
Sr	□	■	■	■	■
Zr	□	■	■	■	■
Mo	□	■	□	□	■
Cd	■	■	■	■	■
Sb	□	□	□	□	■
Sn	■	□	■	□	□
Cs	■	■	■	■	■
Ba	□	■	■	■	■
La	□	■	■	■	■
Ce	□	■	■	■	■
Gd	□	■	■	■	■
Ta	■	■	□	□	■
Pb	□	■	■	■	■

presente in tutti i campioni (95-100%)
 presente in alcuni campioni (5-95%)
 assente (0-5%)

Tabella 15 : Risultati cumulativi delle 5 analisi dei 47 campioni di placenta: intervallo di concentrazione, media, mediana, errore strumentale, errore associato alla procedura ed errore associato al campionamento e alla procedura (espressi come deviazione standard della media)

Elem.	Intervallo (ppm)	Media (ppm)	Mediana (ppm)	Errore strum.	Errore di procedura	Errore di campionamento e procedura
Na	8060-18500	13200	13100	11	130	150
Mg	188-1390	476	456	1.2	19	28
Al	1.38-1680	36.1	5.89	0.066	4.9	12
P	3180-48800	11100	10600	29	513	670
K	4350-17100	11300	11200	14	330	570
Ca	464-81800	4370	1460	4.2	88	580
Ti	0.158-6.64	0.803	0.732	0.016	0.19	0.044
V	0.00661-9.82	0.462	0.0460			
Cr	0.00735-11.3	0.303	0.107			
Mn	0.0479-6.07	0.439	0.356	0.0022	0.035	0.047
Fe	12.9-1192	471	466	1.2	37	14
Co	0.00744-1.22	0.0688	0.0224			0.072
Ni	0.198-11.3	1.53	0.705			
Cu	3.13-41.6	5.54	4.50	0.010	0.13	0.062
Zn	9.24-173.6	54.32	53.9	0.16	1.6	2.7
Ga	0.0178-0.117	0.0642	0.0562			
As	0.00469-0.360	0.0303	0.0143			
Se	0.299-1.14	0.693	0.681	0.0094	0.025	0.039
Rb	7.29-22.5	14.3	14.1	0.024	0.56	0.85
Sr	0.0256-14.3	1.19	0.415	0.0031	0.044	0.14
Zr	0.0283-1.01	0.0892	0.0516			0.074
Mo	0.0109-0.0445	0.0194	0.0161			
Cd	0.00673-0.202	0.0461	0.0358	0.0014	0.0014	0.0032
Sb	0.0513-4.18	1.041	0.254	0.0037		
Sn	0.0159-6.45	0.690	0.0372			
Cs	0.0131-0.133	0.0433	0.0374			
Ba	0.0353-0.744	0.319	0.283			
La	0.00127-0.0353	0.00621	0.00202			
Ce	0.00206-0.153	0.0216	0.0104			
Gd	0.0270-0.107	0.0748	0.0741			
Ta	0.0237-0.338	0.128	0.116			
Pb	0.0127-0.892	0.128	0.0833			

2.11.2. Risultati dei test statistici

In *Tabella 16* sono riportati i risultati del test statistico *Confronto di dati appaiati (dipendenti)* utilizzato per confrontare le concentrazioni tra lato materno e fetale delle placente analizzate. Affinché l'esito del test non risenta della differente concentrazione di

un determinato elemento tra donne sane e diabetiche, è stato eseguito separatamente per il gruppo di pazienti di controllo e per quelle affette da GDM. I risultati sono mostrati in scala cromatica per evidenziare i risultati che hanno dato test positivo. Il test non è stato eseguito nei casi in cui i dati non sono risultati in numero sufficiente.

Tabella 16: Confronto statistico della concentrazione degli elementi tra lato materno e lato fetale delle 47 placente

Elemento	Analisi									
	1		2		3		4		5	
	sane	GDM	sane	GDM	sane	GDM	sane	GDM	sane	GDM
Na	95.1					97.1				
Mg									98.6	
Al	////	////						97.5		
P									98.5	
K	99.0				96.2					
Ca	////	////		96.9					96.2	
Ti	////	////								
V	////	////			////	////	////	////	////	////
Cr							////	////	////	////
Mn	////	////								
Fe							97.5		99.7	
Co	////	////					////	////	////	////
Ni	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////
Cu										
Zn									96.8	
Ga	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////
As	////	////					////	////	////	////
Se						95.8			99.7	
Rb	99.1				97.5					
Sr	////	////		97.0					95.6	
Zr	////	////								
Mo	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////
Cd	95.1									
Sn	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////
Cs					99.0				////	////
Ba	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////
La	////	////	////	////	////	////			////	////
Ce	////	////	////	////	////	////			////	////
Gd	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////
Ta	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////
Tl	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////
Pb	////	////					////	////	////	////

//// test non eseguito □ test negativo ■ test positivo (p-value)

In *Tabella 17* vengono infine riportati, sempre mediante scala cromatica, i risultati dei test *Wilcoxon Mann Whitney* e *t-test di Student* utilizzati per il confronto della concentrazione degli elementi nelle donne sane e diabetiche.

Tabella 17: Confronto della concentrazione degli elementi nelle placente di donne sane e diabetiche

Elemento	Analisi				
	1	2	3	4	5
Na					
Mg			test M. W.		
Al	////////////////		test M. W.	test M. W.	test M. W.
P			test M. W.		
K			test M. W.		
Ca	////////////////				
Ti	////////////////	test t	test t	test t	
V	////////////////	test t	////////////////	////////////////	////////////////
Cr	test t		entrambi		////////////////
Mn	////////////////	test t	test t		
Fe	test M. W.				
Co	////////////////	test t	entrambi	////////////////	////////////////
Ni	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
Cu					
Zn			test M. W.		
Ga	////////////////	////////////////		test t	////////////////
As	////////////////	test t	test t	test t	////////////////
Se	entrambi	entrambi	test t	test t	entrambi
Rb		test M. W.	test M. W.	test M. W.	
Sr	////////////////			test t	
Zr	////////////////	test t	test t		test t
Mo	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
Cd	entrambi	entrambi	test t	test t	test t
Sn	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
Cs	entrambi	test t	test t	entrambi	entrambi
Ba	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
La	////////////////	////////////////	////////////////	test t	////////////////
Ce	////////////////	////////////////	////////////////	test t	////////////////
Gd	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
Ta	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
Tl	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////	////////////////
Pb	////////////////	entrambi	test t	test t	////////////////

//// test non eseguiti □ entrambi i test negativi ■ test positivo (nome del test)

2.11.3. Analisi delle componenti principali

I risultati ottenuti sui 47 campioni di placenta sono stati sottoposti all'analisi delle componenti principali (PCA).

In *Figura 8* è riportato il *Grafico di Scree* nel quale è raffigurata la percentuale di variabilità associata alle diverse componenti (in ordine di importanza) in base alle quali è possibile rappresentare i dati di partenza. Per ottenere il numero di componenti significative è necessario tracciare le tangenti alla curva e quindi determinare l'ascissa del punto di incrocio tra le due rette.

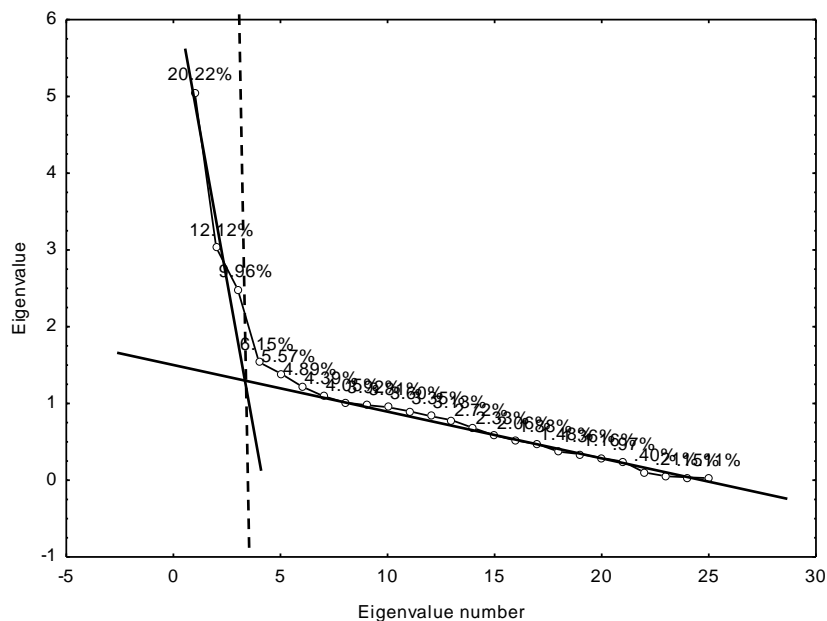


Figura 8: Grafico di Scree delle analisi delle 47 placente

Le componenti significative sono quelle che si trovano a sinistra del punto di incrocio delle due rette; nel nostro caso sono tre. Nel grafico riportato in *Figura 8* è indicata la percentuale di variabilità associata ad ogni componente; per quanto riguarda le tre componenti significative (*Factor 1, 2, 3*), la loro variabilità è rispettivamente pari a 20.22%, 12.12% e 9.98%.

In *Tabella 18* sono riportati, per ognuna delle tre componenti, i coefficienti di correlazione con le diverse variabili. In altre parole, in questa tabella si osserva la correlazione variabile-componente, significativa in caso di coefficienti >0.5 .

Tabella 18: Correlazione variabile-componente nelle analisi delle 47 placente

Elemento	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Na	0.38	-0.58	-0.04
Mg	0.94	0.18	0.10
Al	0.04	0.14	-0.91
P	0.89	0.27	0.15
K	0.70	-0.56	-0.05
Ca	0.62	0.66	0.18
Ti	0.50	0.40	0.03
Cr	0.20	-0.01	-0.56
Mn	0.16	0.15	-0.90
Fe	0.37	-0.06	-0.13
Co	0.00	-0.01	-0.34
Cu	0.07	-0.18	-0.02
Zn	0.73	0.01	0.00
Ga	0.16	0.27	-0.51
As	0.31	-0.07	0.00
Se	0.57	-0.53	0.02
Rb	0.54	-0.54	-0.05
Sr	0.60	0.63	0.18
Zr	0.00	0.12	-0.09
Mo	-0.03	-0.08	-0.03
Cd	0.30	0.19	0.09
Sn	-0.04	-0.15	0.00
Cs	0.43	-0.63	0.01
Ce	0.01	0.29	-0.01
Pb	0.04	0.02	-0.13

Risulta quindi utile rappresentare i dati in due dimensioni mediante le componenti *Factor 1* e *Factor 2* alle quali è associato il massimo della variabilità. In questo modo si ottiene una rappresentazione semplificata dei dati che inevitabilmente comporta una perdita di informazioni rispetto alla rappresentazione originale. È possibile calcolare la percentuale di informazione mantenuta sommando le percentuali di variabilità associata alle due componenti. Nel nostro caso viene conservato il 32.34% dell'informazione originale.

In *Figura 9* è mostrato il *Grafico dei loadings* nel quale si può osservare graficamente quanto riportato in *Tabella 18*.

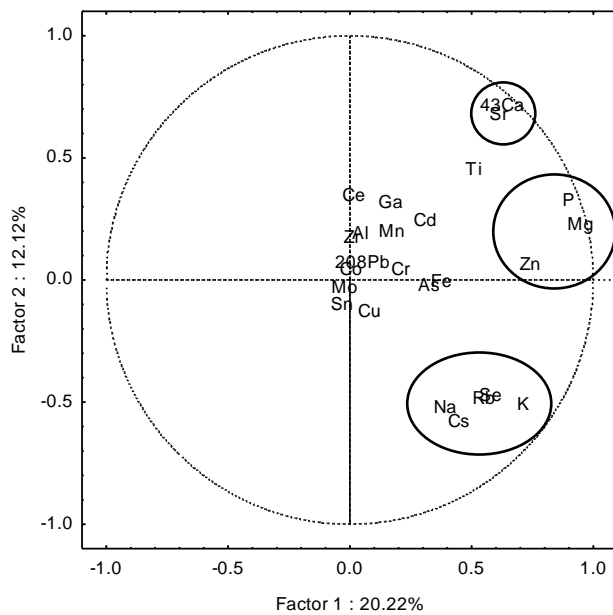


Figura 9: Grafico dei loadings nelle analisi delle 47 placente

In questo grafico il verso, la direzione ed il modulo del vettore che collega l'origine degli assi alla posizione della variabile forniscono importanti informazioni. In particolare il verso di ogni vettore fornisce indicazioni riguardo la zona in cui quella determinata variabile aumenta di concentrazione; la direzione del vettore esprime la correlazione con le due componenti riportate sugli assi mentre il modulo del vettore è indice dell'importanza di quella variabile all'interno del piano. Si deduce che gli elementi al centro del grafico non sono significativi per nessuno dei due fattori.

In *Figura 10* è rappresentato il *Grafico degli scores*, ovvero gli oggetti in esame, nel grafico bidimensionale delle due componenti principali *Factor1* e *Factor 2*.

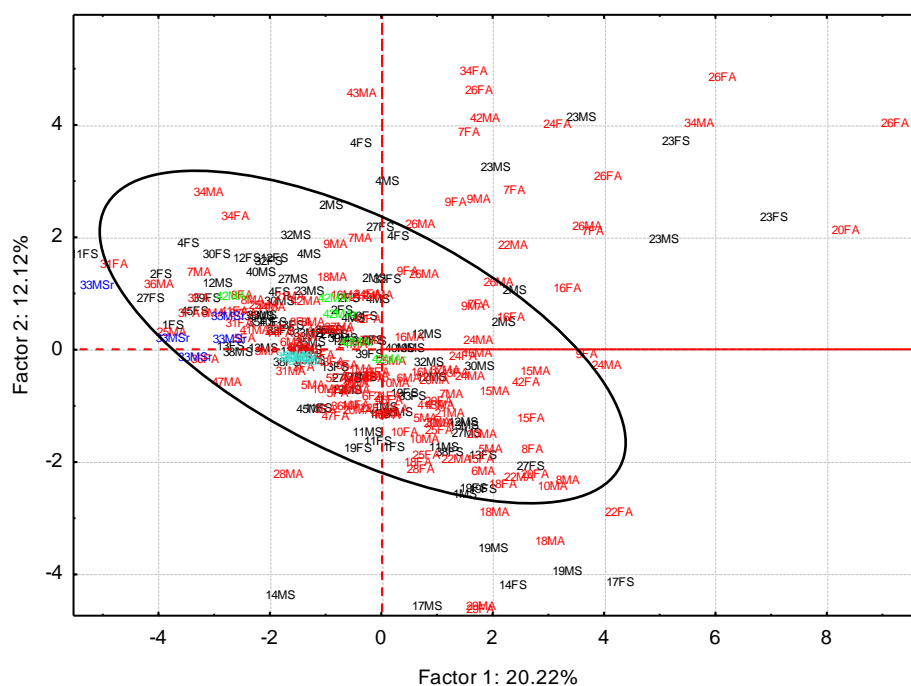


Figura 10: Grafico degli scores nelle analisi delle 47 placente

(MS: donna sana- lato materno, FS: donna sana- lato fetale, MA: donna diabetica-lato materno, FA: donna diabetica, lato fetale)

In rosso sono evidenziati gli oggetti riferiti alle donne che hanno sviluppato il diabete gestazionale, in nero quelli riferiti alle donne sane, in azzurro i dati relativi alle prove ripetute della stessa soluzione (errore strumentale), in blu quelli riferiti alle prove ripetute su un campione omogeneizzato (errore sulla procedura) e in verde quelli relativi alle prove ripetute su diversi campioni della stessa paziente (errore sulla procedura e sul campionamento).

Analogamente a quanto detto sopra, la posizione di un determinato oggetto nel piano fornisce informazioni riguardo la correlazione con le due componenti, a loro volta correlate con le diverse variabili secondo quanto riportato in Figura 9.

Un'ulteriore analisi delle componenti principali è stata eseguita considerando solamente le variabili per le quali i test statistici di confronto donne sane-donne diabetiche sono risultati significativi e per i quali la positività è stata confermata in più analisi.

Di seguito sono quindi riportati i dati della PCA eseguita considerando gli elementi Se, As e Cd: in Figura 11 è riportato il Grafico dei loadings, in Tabella 19 la correlazione variabile-componente mentre in Figura 12 il Grafico degli scores nel piano delle componenti Factor1-Factor2.

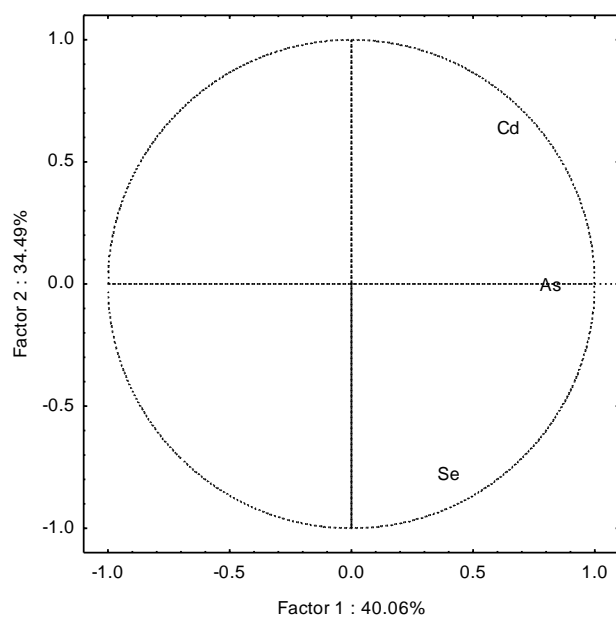


Figura 11: Grafico dei loadings, limitato agli elementi Cd, As, Se, nelle analisi delle 47 placente

In questa PCA viene mantenuto il 74.55% delle informazioni originali.

Tabella 19: Correlazione variabile-componente, limitata agli elementi Cd, As, Se, nelle analisi delle 47 placente

Elemento	Factor 1	Factor 2	Factor 3
As	0.803761	-0.057887	0.592129
Se	0.390344	-0.830926	-0.396477
Cd	0.635252	0.583822	-0.505576

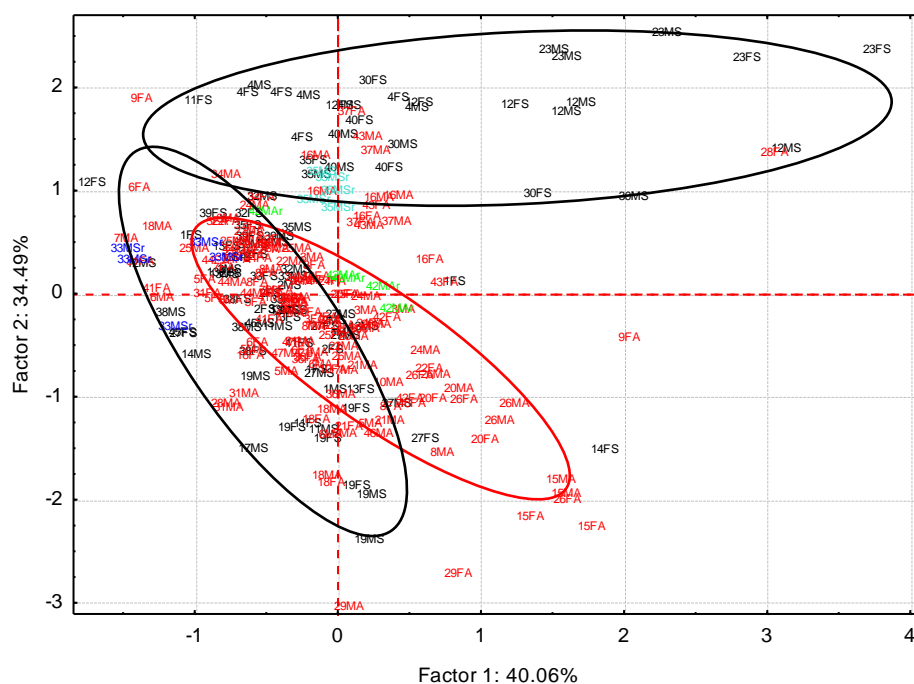


Figura 12: Grafico degli scores, limitato agli elementi Cd, As, Se, nelle analisi delle 47 placente

2.12. Analisi dei campioni di sangue

La grande variabilità riscontrata nella concentrazione degli elementi nel tessuto placentare è stata attribuita alla diversa presenza del sangue nel tessuto, che potrebbe modificare significativamente i risultati a seconda della quantità prelevata assieme al tessuto stesso. È stato possibile disporre di piccole quantità di campioni di sangue delle stesse pazienti per le quali è stata analizzata la placenta, anche in questo caso sia del lato materno che fetale (cordone ombelicale), per cui anche tali campioni (nel numero totale di 37, di cui 36 appartenenti alle donne di cui è stata analizzata anche la placenta) sono stati sottoposti ad analisi via ICP-MS.

I campioni sono stati preparati pesando esattamente circa 300 µL di sangue ed aggiungendo 1 mL HNO₃ 69%. Dopo la digestione la soluzione è stata diluita a 15 mL. Per ogni campione è stata determinata la concentrazione di tutti gli elementi presenti e sono stati eseguiti i test statistici per il confronto lato materno-lato fetale e tra donne sane e diabetiche.

2.12.1. Presenza degli elementi e concentrazioni

In Tabella 20 e Tabella 21 sono riportati i risultati dell'analisi e dei test statistici eseguiti.

Tabella 20: Analisi dei 37 campioni di sangue delle medesime pazienti per le quali sono state analizzate le placente. Percentuale di presenza, intervallo di concentrazione, media e mediana

Elem.	% presenza	Intervallo di conc.(ppm)	Media (ppm)	Mediana (ppm)
Na		1350-3100	2000	1990
Mg		12.7-31.4	21.0	20.8
Al		0.493-2.11	1.12	1.09
P		131-490	347	366
K		769-3200	2000	1960
Ca		30.7-135	48.1	40.4
Ti		0.00818-0.205	0.0413	0.0283
V				
Cr		0.0303-0.169	0.0715	0.0495
Mn		0.00384-0.0393	0.0214	0.0222
Fe		24.3-642	405	426
Co				
Ni				
Cu		0.422-2.19	1.08	0.852
Zn		0.126-7.42	2.72	2.03
Ga		0.00568-0.0210	0.00907	0.00728
As				
Se		0.00854-0.119	0.0587	0.0525
Rb		0.281-2.80	1.64	1.69
Sr		0.00509-0.0527	0.0211	0.0196
Zr		0.0146-0.0348	0.0228	0.0223
Mo		0.00461-0.0168	0.00815	0.0679
Cd				
Sb		0.00792-0.726	0.156	0.0265
Sn				
Cs				
Ba		0.00316-0.123	0.0413	0.0333
La				
Ce				
Gd				
Ta				
Tl				
Pb		0.0298-0.0489	0.0387	0.0374

presente in tutti i campioni (95-100%)
 presente in alcuni campioni (5-95%)
 assente (0-5%)

2.12.2. Risultati dei test statistici

Tabella 21: Analisi dei 37 campioni di sangue delle medesime pazienti per le quali sono state analizzate le placente. Confronto della concentrazione degli elementi tra lato materno e lato fetale e tra donne sane e diabetiche

Elemento	Confronto lato M-F		Confronto sane-GDM
	sane	GDM	
Na	100.0	99.9	
Mg			test M.W.
Al			entrambi
P	98.4	98.8	
K	100.0	100.0	
Ca	97.7	96.2	
Ti			test t
V	////	////	////
Cr	////	////	////
Mn	////	////	////
Fe	100.0	99.9	
Co	////	////	////
Ni	////	////	////
Cu	100.0	100.0	
Zn	100.0	100.0	
Ga	////	////	test t
As	////	////	////
Se	97.0	98.8	entrambi
Rb	100.0	100.0	test t
Sr		99.2	test t
Zr			test t
Mo	////	////	////
Cd	////	////	////
Sb	////	////	////
Sn	////	////	////
Cs	////	////	////
Ba			test t
La	////	////	////
Ce	////	////	////
Gd	////	////	////
Ta	////	////	////
Tl	////	////	////
Pb	////	////	////

//// test non eseguito □ test negativo ■ test positivo (p-value o nome del test)

2.12.3. Analisi delle componenti principali

Vengono di seguito riportati i grafici relativi alla PCA dei 37 campioni di sangue. In *Figura 13* è riportato il *Grafico di Scree* da cui si ottiene che le componenti significative sono 2 cui è associata la seguente variabilità: *Factor 1*: 27.48 %, *Factor 2*: 12.73 %. In *Tabella 22* si osserva invece la correlazione variabile-componente.

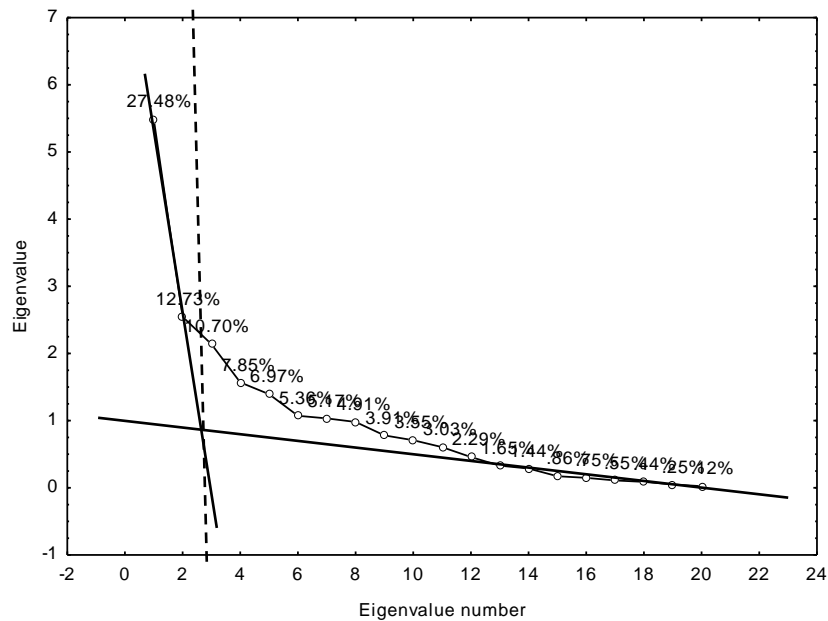


Figura 13: Grafico di Scree per le analisi dei 37 campioni di sangue

Tabella 22: Correlazione variabile-componente per le analisi dei 37 campioni di sangue

Elemento	Factor 1	Factor 2
Na	0.89	0.16
Mg	0.23	0.39
Al	-0.19	0.74
P	-0.87	0.24
K	-0.94	0.03
Ca	0.37	0.32
Ti	0.07	0.31
Cr	0.08	-0.09
Mn	-0.27	-0.35
Fe	-0.96	0.07
Cu	0.69	0.28
Zn	0.08	0.56
Ga	-0.07	0.42
Se	-0.55	0.20
Rb	-0.93	0.12
Sr	0.35	0.45
Zr	-0.19	0.75
Cd	-0.02	-0.12
Sb	0.03	0.06
Pb	0.05	-0.11

Vengono quindi riportati il *Grafico dei loadings* (Figura 14) e degli *scores* (Figura 15).

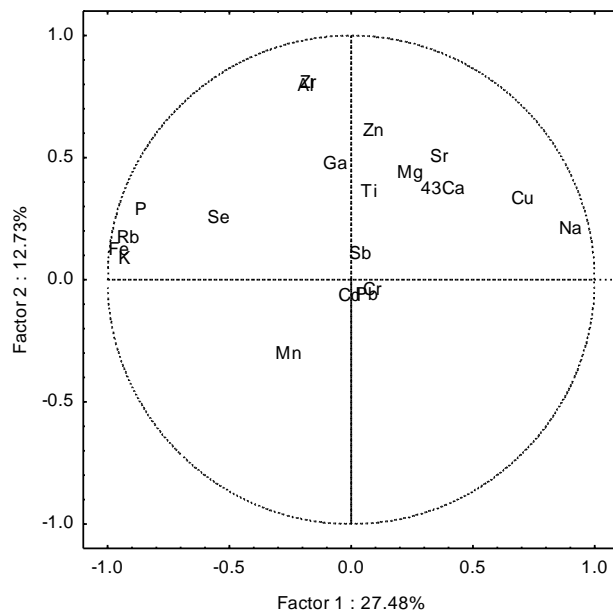


Figura 14: Grafico dei loadings per le analisi dei 37 campioni di sangue

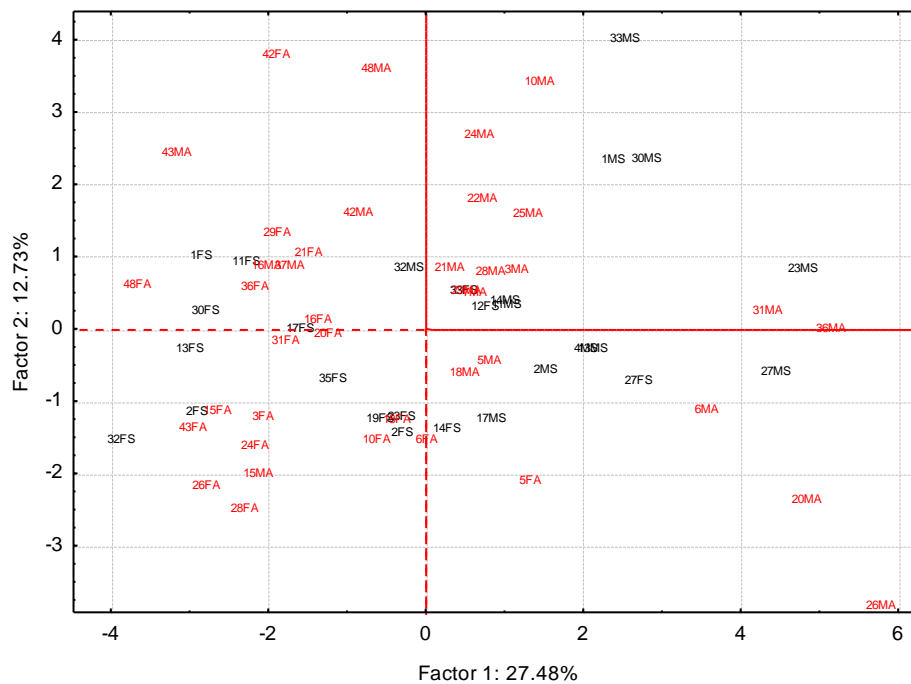


Figura 15: Grafico degli scores per le analisi dei 37 campioni di sangue

Infine sono stati plottati gli elementi nel piano delle concentrazioni dei due elementi risultati significativamente diversi tra il gruppo di donne sane e diabetiche: Se e Al.

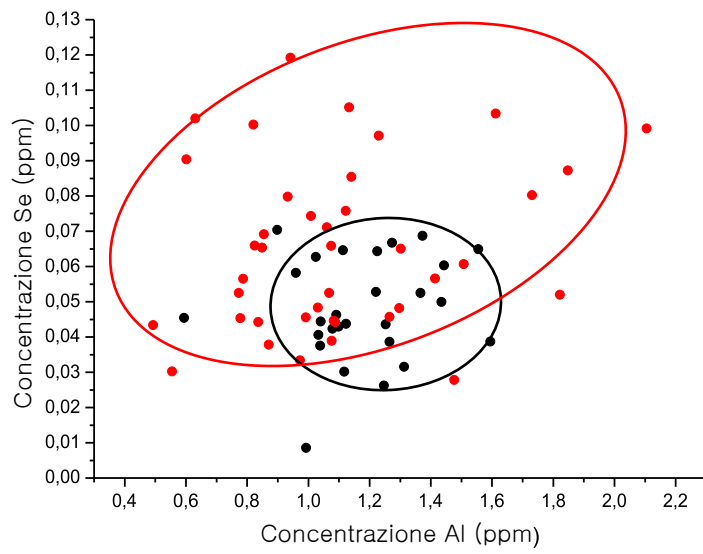


Figura 16: Rappresentazione dell'analisi dei 37 campioni di sangue nel piano Concentrazione Al-Concentrazione Se

3. Discussione

3.1. Metodo di analisi

In questo lavoro di tesi è stato messo appunto un metodo per l'analisi degli elementi presenti nelle placente mediante tecnica ICP-MS; questo metodo prevede di pesare esattamente ca. 200 mg di campione precedentemente liofilizzato, aggiungere 3 g di HNO₃ 69%, digerire mediante riscaldamento a microonde e diluire con acqua MilliQ fino ad ottenere una soluzione acida al 4% p/p. In tale maniera si riesce sia a portare in soluzione l'intero campione, ottenendo una soluzione trasparente analizzabile con l'ICP-MS, sia di ottimizzare (cioè rendere minimo) il limite di rivelabilità. Come si può vedere in *Tabella 11*, la seconda analisi di prova permette di determinare la concentrazione di un numero maggiore di elementi rispetto alla prima prova, ed anche i limiti di rivelabilità risultano nella maggior parte dei casi migliori.

Con la prova di recupero è stata dimostrata l'efficacia del metodo utilizzato; oltre che dallo strumento, il recupero di un certo elemento dipende dalla procedura utilizzata per la preparazione dei campioni (pesata, digestione, diluizione). Nel nostro caso, le percentuali di recupero si discostano poco rispetto al 100% per la maggior parte degli elementi, come riportato in *Tabella 13*. Si è anche dimostrato che il metodo di preparazione utilizzato comporta perdite minime nei diversi passaggi, e che il tessuto placentare non influenza la determinazione della concentrazione degli elementi; in altre parole non si ha un effetto rilevante da parte della matrice biologica. Due eccezioni sono rappresentate da P e Cd per i quali si ottengono percentuali di recupero molto diverse da 100. P, cui è associata una percentuale di recupero pari al 390%, è considerato un elemento difficilmente analizzabile con la tecnica ICP-MS (come già sottolineato nel paragrafo 1.5.1.). Al contrario la bassa percentuale di recupero ottenuta per Cd, pari al 15%, può essere giustificata dalla presenza di alte concentrazioni di cloruri nel tessuto placentare. Si è ipotizzato che questi possano formare dei complessi neutri con il Cd che possono essere persi durante la fase di digestione.

3.2. Analisi dei campioni di placenta

Per quanto riguarda i campioni di placenta, dai risultati riportati in *Tabella 15* si osserva come gli intervalli di concentrazione per i diversi elementi sono molto ampi, indice della grande variabilità tra i campioni. Anche dai dati di letteratura emerge un'ampia variabilità; ad esempio, gli intervalli di concentrazione per Sr, Al, As, Cd, Pb, Ba, Ni, Mo e Co risultano molto estesi e comprendono in alcuni casi addirittura due ordini di grandezza. Anche nel nostro caso gli intervalli di concentrazione per elementi quali Al, Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cd, As, Sr, Zr, Sb, Sn e Ce risultano particolarmente ampi.

Inoltre la distribuzione dei valori delle concentrazioni spesso non è omogenea, soprattutto per gli elementi Al, V, Cr, Co, Ni, Sr, Sb, Mn e Sn. In *Figura 17* è riportato un esempio di distribuzione omogenea (Na) e disomogenea (Mn) delle concentrazioni.

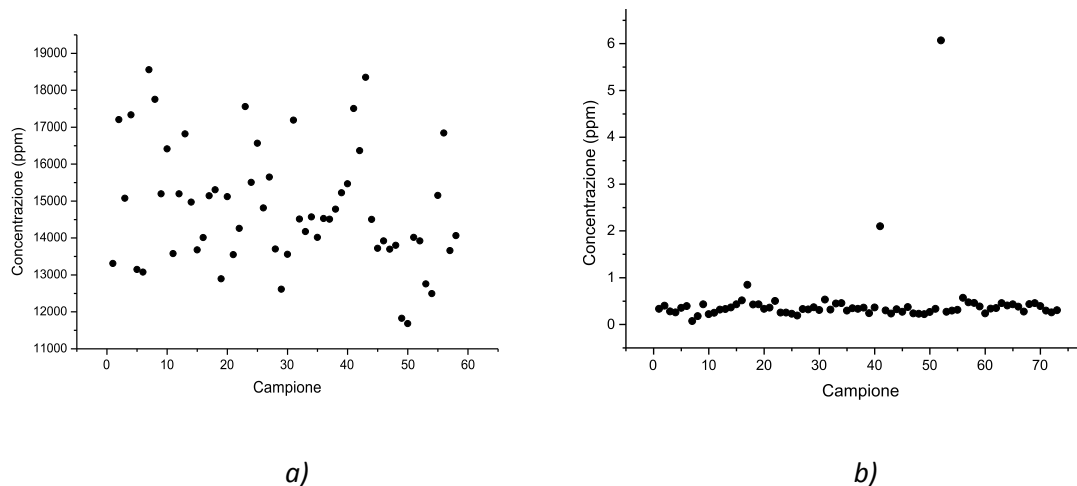


Figura 17: Esempio di distribuzione omogenea (Na, grafico a) e disomogenea (Mn, grafico b) delle concentrazioni nei 47 campioni di placenta

Per tener conto di questa disomogeneità si è preferito riportare sia il valore di concentrazione media che quello di concentrazione mediana, in quanto quest'ultimo risente meno del tipo di distribuzione. Per gli elementi distribuiti omogeneamente i valori di concentrazione media e mediana sono per lo più concordi; questo si verifica in particolare nel caso degli elementi presenti ad elevata concentrazione, quali Na, Mg, P, K, Fe, Cu, Zn, Rb e Se. Negli altri casi concentrazione media e mediana differiscono maggiormente.

Osservando infine gli errori strumentale, di procedura e di campionamento/procedura riportati sempre in *Tabella 15*, si può notare come i primi siano molto inferiori rispetto agli altri.

Definendo il coefficiente di variazione percentuale (C.V. %) secondo la formula:

$$C.V. \% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

in cui s rappresenta la deviazione standard e \bar{x} la media sulle diverse misure, si ottiene che il C.V. % per gli errori di campionamento/procedura, di procedura e strumentale sono rispettivamente mediamente pari al 30%, 10% e 2.6%. Si deduce quindi che l'alta variabilità delle concentrazioni è associata al campionamento.

Dai risultati ottenuti con il test di confronto lato materno-lato fetale riportati in *Tabella 16* non emergono differenze significative tra le due parti. I risultati dei test infatti non si ripetono né all'interno di una stessa analisi tra il gruppo di donne sane e diabetiche, né nelle diverse analisi eseguite. Questo può essere dovuto alla variabilità nella concentrazione degli elementi nel tessuto placentare all'interno dello stesso campione.

Dai risultati ottenuti con i test parametrici e non parametrici per il confronto delle concentrazioni tra donne sane e donne diabetiche riportati in *Tabella 17* si osserva che per Se e Cd i risultati dei test sono concordi. In particolare la concentrazione di Se risulta sistematicamente maggiore nelle donne diabetiche mentre Cd risulta maggiormente concentrato nelle donne sane (tranne che in un'analisi). In *Tabella 23* sono riportate le concentrazioni mediane per Se e Cd nelle diverse analisi per i due gruppi di pazienti.

Tabella 23: Concentrazione mediana di Se e Cd nelle donne sane e diabetiche nelle 5 analisi eseguite

Elemento	Gruppo	Concentrazione mediana (ppm)				
		Analisi 1	Analisi 2	Analisi 3	Analisi 4	Analisi 5
Se	sane	0.731	0.742	0.667	0.588	0.575
	GDM	0.795	0.781	0.712	0.621	0.631
Cd	sane	0.102	0.0538	0.0313	0.0310	0.0379
	GDM	0.0484	0.0371	0.0321	0.0272	0.0326

Per quanto riguarda l'analisi delle componenti principali, dal *Grafico dei loadings* riportato in *Figura 9* si osservano 3 gruppi di variabili correlate, cerchiato in nero. In particolare Mg-P-Zn (gruppo A) sono rappresentativi della componente *Factor 1*, mentre Ca-Sr (gruppo B) e Na-Cs-Rb-Se-K (gruppo C) sono rappresentativi di entrambe le componenti *Factor 1* e *Factor 2*. Inoltre i vettori che collegano il centro degli assi al gruppo B e al gruppo C risultano ortogonali: questo indica che i due gruppi di variabili non sono correlati.

Infine in questo grafico si può osservare la forte correlazione tra variabili nel caso in cui risultano sovrapposte (come nel caso di Rb-Se e Sr-Ca). Questa correlazione potrebbe avere un senso chimico/biologico non deducibile con questa rappresentazione.

Dal *Grafico degli scores* riportato in *Figura 10* non emergono differenze significative tra i due gruppi di donne. Si osserva comunque un cluster di elementi nella zona centrale che si sviluppa all'interno di un ellissoide (cerchiato in *Figura 10*) sviluppato nella direzione del vettore associato alle variabili Na, Se, Rb, Cs e K presenti nel quarto quadrante.

È interessante osservare la dispersione dei punti colorati in azzurro, blu e verde. I primi sono rappresentativi dell'errore strumentale (quindi della ripetibilità delle misure) e risultano molto sovrapposti. Molto più dispersi sono invece gli elementi rappresentativi dell'errore sulla procedura (in blu) e sul campionamento/procedura (verde). Si percepisce quindi come il campionamento rappresenti il problema principale nell'analisi statistica dei campioni di placenta in quanto copre la variabilità tra i due gruppi di pazienti.

Per quanto riguarda la PCA eseguita considerando le sole variabili Cd, As e Se, dal *Grafico dei loadings* riportato in *Figura 11* si osserva come le variabili Cd e Se risultino indipendenti in quanto i vettori loro associati sono ortogonali. In questo grafico emerge che As è correlato alla componente *Factor 1* mentre Cd e Se sono correlati ad entrambe le componenti *Factor 1* e *Factor 2*.

Dal *Grafico degli scores* riportato in *Figura 12* si osserva come gli elementi riferiti alle pazienti diabetiche siano per la maggior parte concentrati in un solo cluster, all'interno dell'ellissoide sviluppato nella direzione del vettore associato al Se (cerchiato in rosso in *Figura 12*), indice che questo elemento tende a separare i due gruppi di pazienti. Nel quarto quadrante, zona in cui è associata una maggiore concentrazione di Se, si osservano infatti più pazienti diabetiche (in rosso), che sane (in nero). Al contrario gli elementi associati alle donne sane sono situati principalmente in due cluster (cerchiati in nero): il primo ellissoidale sviluppato nel secondo-terzo-quarto quadrante mentre il secondo situato principalmente nel primo quadrante. Da questo grafico si osserva dunque come Se e Cd siano effettivamente due elementi chiave nella separazione di questi due gruppi di pazienti, in quanto nel primo quadrante sono presenti più donne sane, nel quarto più donne diabetiche. Tali evidenze concordano con quanto ottenuto con i test statistici di confronto donne sane-donne diabetiche discussi precedentemente.

3.3. Analisi dei campioni di sangue

Analogamente ai campioni di placenta, anche nei campioni di sangue si osserva una grande variabilità nelle concentrazioni degli elementi (*Tabella 20*), soprattutto nel caso di Al, Ti, Se e Ba. Le concentrazioni medie e mediane risultano invece particolarmente differenti nel caso di Cr, Mo e Sb.

Dai risultati ottenuti con il test di confronto lato materno-lato fetale (*Tabella 21*) si ottengono molte più differenze significative tra i due lati rispetto a quanto emerso nell'analisi delle placente; inoltre i risultati sono confermati (ad eccezione di Sr) sia nel gruppo delle pazienti sane che diabetiche. Questa maggiore ripetibilità nei due gruppi potrebbe essere dovuta ad una maggiore omogeneità della matrice analizzata. In particolare questo test è risultato positivo in entrambi i gruppi per molti elementi analizzati: Na, P, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Se e Rb.

I risultati ottenuti con i test di confronto della concentrazione degli elementi presenti nelle donne sane e diabetiche hanno confermato l'esistenza di una differenza significativa nella concentrazione di Se tra i due gruppi di pazienti; anche nel caso dei campioni di sangue la concentrazione di Se è risultata maggiore nelle pazienti diabetiche (concentrazione mediana: 0.0628 ppm) rispetto alle pazienti sane (concentrazione mediana: 0.0454 ppm). Questo risultato è di fondamentale importanza e testimonia l'effettiva influenza nella concentrazione dei diversi elementi da parte del sangue nei campioni di placenta.

Per quanto riguarda l'analisi PCA, dal *Grafico dei loadings* riportato in *Figura 14* si vede che le variabili P, Rb, Fe e K sono inversamente correlate con la componente *Factor 1*, le variabili Na e Cu sono correlate con la componente *Factor 1* mentre Zr e Al sono correlati con la componente *Factor 2*. In particolare le variabili Zr-Al e Cr-Pb risultano particolarmente sovrapposte e potrebbero essere correlate per cause chimico/biologiche finora sconosciute.

Dal *Grafico degli scores* in *Figura 15* non si osservano suddivisioni né cluster di elementi che, al contrario, risultano dispersi in maniera omogenea nei quattro quadranti.

Più interessante è invece la rappresentazione degli elementi nel grafico *Concentrazione Al-Concentrazione Se*. Dal grafico riportato in *Figura 16* si può notare che le donne diabetiche (in rosso) presentano una concentrazione molto variabile di Se e Al, mentre le donne sane (in nero) sono caratterizzate da valori di concentrazione mediamente più localizzati. Inoltre

si osserva che la concentrazione di Se nelle donne diabetiche è mediamente superiore a quella riscontrata nelle donne sane. Questo risultato è concorde con quanto ottenuto nei test statistici di confronto tra i due gruppi di pazienti e nei campioni di placenta.

4. Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono stati complessivamente analizzati 47 campioni di placenta, di cui 19 provenienti da donne sane e 28 da donne affette da diabete mellito gestazionale (GDM); di ogni campione è stato analizzato sia il lato materno che quello fetale. Complessivamente sono state eseguite 5 analisi in tempi differenti con ICP-MS sugli stessi 47 campioni. Inoltre sono stati analizzati 37 campioni di sangue (anche in questo caso sia quello materno che quello fetale, prelevato dal cordone ombelicale), 15 provenienti da donne sane, 22 da donne diabetiche. I campioni di sangue appartenevano alle stesse pazienti di cui è stata analizzata la placenta.

È stato quindi messo appunto un metodo analitico per l'analisi di questi campioni con l'ICP-MS; complessivamente è stato possibile determinare 33 elementi (Na, Mg, Al, P, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Rb, Sr, Zr, Mo, Cd, Sb, Sn, Cs, Ba, La, Ce, Gd, Ta, Tl, Pb). Sono state condotte inizialmente delle analisi di prova per ottimizzare le quantità di campione da pesare e la quantità di acido da aggiungere in modo da ottenere il minimo limite di rivelabilità possibile; in seguito sono state fatte diverse prove per stimare l'errore strumentale, quello associato alla procedura analitica e infine quello associato al campionamento del tessuto placentare.

L'utilizzo dei test statistici e dell'analisi delle componenti principali (PCA) hanno infine permesso di ottenere informazioni riguardo la presenza di eventuali differenze nella concentrazione tra i diversi gruppi di donne. In particolare il test statistico per il confronto di dati appaiati (dipendenti) è stato utilizzato per il confronto delle concentrazioni degli elementi tra lato materno e lato fetale (sia delle pazienti sane che di quelle diabetiche), mentre il test non parametrico di Wilcoxon Mann Whitney della somma dei ranghi e quello parametrico t-test di Student sono stati usati per il confronto delle concentrazioni nel gruppo di donne sane e nel gruppo di donne diabetiche.

Con questo lavoro di tesi è stato quindi ottenuto innanzitutto uno screening completo degli elementi contenuti nel tessuto placentare, finora mancante in letteratura; inoltre è emerso che la concentrazione di Se risulta significativamente maggiore nelle placente e nel sangue delle donne diabetiche, mentre Cd risulta più concentrato nelle placente di donne sane.

Questi risultati non concordano con alcuni dei dati riportati in letteratura e riguardanti l'analisi del sangue o del siero sanguigno di persone affette da diabete non gestazionale: in alcune di queste analisi, infatti, la concentrazione di Se risulta minore nelle pazienti

diabetiche mentre quella di Cd risulta maggiore. Ricordiamo però che il confronto delle concentrazioni degli elementi in diverse matrici biologiche (sangue, siero sanguigno e placenta) potrebbe non essere del tutto corretto, senza contare che anche la patologia studiata è differente. Inoltre, la maggior parte dei risultati riportati in letteratura sono stati ottenuti con tecniche diverse dall'ICP-MS, e quindi potrebbero presentare errori anche rilevanti sulle concentrazioni più basse. Si evidenzia comunque la necessità di proseguire le ricerche su questo argomento, soprattutto sul tessuto placentare, finora poco analizzato.

Nell'analisi dei campioni di placenta è d'altronde emersa la difficoltà di analizzare i tessuti biologici in quanto la grande variabilità nelle concentrazioni degli elementi tra campioni diversi e all'interno dello stesso campione rende complicata l'interpretazione dei dati. Questo emerge anche da quanto riportato in letteratura, dove si osservano intervalli di concentrazione molto ampi per uno stesso elemento. Si evidenzia quindi che nell'analisi degli elementi nelle placente il metodo di campionamento del tessuto risulta critico, probabilmente perché gli elementi presenti in tracce (ppm o ppb) presentano variazioni regionali anatomiche e, probabilmente, funzionali nella concentrazione che rendono difficile un campionamento adeguato. Infine ci potrebbero essere diversi fattori soggettivi (fumo, occupazione, provenienza, malattie) che influenzano la concentrazione degli elementi nelle diverse placente, aumentando ulteriormente la variabilità dei dati, per cui sarebbe necessario acquisire più informazioni sulle pazienti e disporre di un numero maggiore di campioni.

Oltre alla differente composizione propria del tessuto, è stato ipotizzato che anche il contenuto di sangue nel tessuto influenzi la concentrazione degli elementi. Questa ipotesi è stata confermata dalle analisi eseguite sui campioni di sangue, dalle quali si evidenzia la necessità di eliminare questo contributo che aumenta la dispersione dei dati e le concentrazioni degli elementi.

In prospettiva ci si propone di lavare il tessuto per diminuire il contenuto di sangue e minimizzare così la dispersione dei dati. Inoltre, ci si propone di analizzare una stessa zona per tutti i campioni per diminuire il contributo della variabilità regionale.

5. Bibliografia

- [1] Diabete e malattie del metabolismo, D. Fedele, 2009, Pacini, 7-90
- [2] Manuale di diabetologia e malattie del metabolismo, D. Fedele, R. Toniato, 2003, Bios, 43-58
- [3] Il diabete mellito, A. Tiengo, S. Del Prato, P. Tessari, A. Avogaro, 1990, Liviana Editrice, 29-48
- [4] Diabete in gravidanza: che cosa è cambiato, che cosa sta cambiando, M. Bonomo, *Giornale italiano di diabetologia e metabolismo*, 2013, 33, 173-175
- [5] Gestational Diabetes Mellitus, D.R. Coustan, *Clinical Chemistry*, 2013, 59, 9, 1310-1321
- [6] Diabete gestazionale: ripensare il percorso assistenziale dopo l'adozione dei nuovi criteri diagnostici, G. Di Cianni, E. Lacaria, L. Russo, C. Sannino, D. Vaccari, A. Citernes, *Giornale italiano di diabetologia e metabolismo*, 2013, 33, 182-188
- [7] *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*, American Diabetes Association, *Diabetes Care*, 2008, 31, 1, S55-S60
- [8] La terapia dietetica nella gravidanza diabetica, Raccomandazioni, G. Di Cianni, G. Fatati, A. Lapolla, S. Leotta, D. Mannino, P. Parillo, G. Pipicelli, Associazione Medici Diabetologi (AMD), Associazione Italiana di Dietetica e Nutrizione Clinica, Società Italiana di Diabetologia (SID), linee guida, 2006
- [9] Ellenberg & Rifkin - Il diabete mellito, D. jr. Porte, R. S. Sherwin, 1999, Milano, Mediserve, 887-916
- [10] Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes, A. Ben-Haroush, Y. Yogeve, M. Hod, *Diabetic Medicine*, 2003, 21, 103-113
- [11] Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis, L. Bellamy, J. P. Casas, A. D. Hingorani, D. Williams, *Lancet*, 2009, 373, 1773-1779
- [12] *Gestational Diabetes During and After Pregnancy*, C. Kim, A. Ferrara (Editors), 2010, Springer, Londra, 71-83
- [13] Gestational diabetes mellitus, S. N.Kumar, Review Article, 115-119
- [14] M. Roverso, Tesi di Laurea Magistrale in Chimica Industriale, Sviluppo di un metodo analitico per la valutazione dei cambiamenti a livello proteico indotti sul tessuto placentare da diabete gestazionale, Università di Padova, Anno Accademico 2011-2012
- [15] Un file dati per il diabete mellito gestazionale, B. Pintaudi, A. Nicolucci, *Giornale italiano di diabetologia e metabolismo*, 2013, 33, 219-224
- [16] Manuale di diabetologia, R. Klinger, P. M. Vita, 1993, OEMF, Milano, 79-114

- [17] Compendio di ginecologia e ostetricia, P. V. Grella, A. Maroso, Monduzzi, Bologna, 1996, 593-607
- [18] Lo screening e la diagnosi del diabete gestazionale: nuove raccomandazioni, A. Lapolla, F. G. Giorgino, Rivista Italiana di Ostetricia e Ginecologia, 2010, 26, 207-210
- [19] Protocollo del diabete gestazionale, Azienda provinciale per i servizi sanitari, Provincia autonoma di Trento, Ospedale di Rovereto, 2012
- [20] Raccomandazioni per screening e diagnosi del diabete gestazionale 06.07.11, Sistema Nazionale Linee Guida-ISS (SNLG-ISS), Società Italiana di Diabetologia (SID), Associazione Medici Diabetologi (AMD), Centro per la Valutazione dell'efficacia dell'assistenza sanitaria (CeVEAS)
- [21] Iron status in women with and without gestational diabetes mellitus, M. Afkhami-Ardekani, M. Rashidi, Journal of Diabetes and its Complications, 2009, 23, 194-198
- [22] Blood Metal Concentration in Type 1 and Type 2 Diabetics, G. Forte, B. Bocca, A. Peruzzu, F. Tolu, Y. Asara, C. Farace, R. Oggiano, R. Madeddu, Biological Trace Elements Research, 2013, 156, 1-3, 79-90
- [23] Assessment of Concentration of Lead, Cadmium, Chromium and Selenium in Blood Serum of Cancer and Diabetics Patients of Pakistan, Journal of Chemical Society of Pakistan, M. Salman, R. Rehman, T. Mahmud, W. U. Zaman, U. Shafique, J. Anwar, S. Z. Ali, 2011, 33, 6, 869-873
- [24] Quantification and Comparison of Some Heavy Metals in Scalp hair, Finger Nails and Plasma of Diabetic Patients of Sargodha Zone (Pakistan), I. H. Bukhari, M. Shoaib, M. J. Sarwar, S. Hafeez, T. H. Bokhari, S. A. R. Naqvi, Journal of Chemical Society of Pakistan, 2012, 34, 4, 877-880
- [25] Role of redox metals, oxidative protein products and antioxidant potentials of thiols in diabetic retinopathy, Prathima, Sindhu, B. Shetty, Sudha K, G. Rao, Journal of Medical Biochemistry, 2012, 31, 2, 126-130
- [26] Status of Toxic Metals in Biological Samples of Diabetic Mothers and Their Neonates, N. F. Kolachi, T. G. Kazi, H. I. Afridi, N. Kazi, S. Khan, G. A. Kandhro, A. Q. Shah, J. A. Baig, S. K. Wadhwa, F. Shah, M. K. Jamali, M. B. Arain, Biological Trace Elements Research, 2011, 143, 196-212
- [27] Trace elements status in diabetes mellitus type 2: Possible Role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications, C. Rodriguez Flores, M. Preciado Puga, K. Wrobel, M. E. G. Sevilla, K. Wrobel, Diabetes Research and Clinical Practice, 2011, 91, 333-341

- [28] Zinc and multi-mineral supplementation should mitigate the pathogenic impact of cadmium exposure, M. F. McCarty, *Medical Hypotheses*, 2012, 79, 642–648
- [29] Cadmium, lead, arsenic and selenium levels in patients with type 2 diabetes mellitus, O. Akinloye, K. Ogunleye, O. O. Oguntibeju, *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9, 32, 5189-5195
- [30] Arsenic and diabetes: Current perspectives, C. F. Huang, Y. W. Chen, C. Y. Yang, K. S. Tsai, R. S. Yang, S. H. Liu, *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 2011, 27, 402-410
- [31] *Embriologia umana, Morfogenesi, Processi Molecolari, Aspetti Clinici*, M. De Felice, C. Boitani, M. Bouchè, R. Canipari, A. Dolfi, A. Filippini, A. Musarò, G. Papaccio, A. Salustri, 2014, Piccin, Padova, 407-424
- [32] *Manuale di ostetricia e ginecologia*, A. Cardone, C. Balbi, N. Colacurci, 2006, Piccin, Padova, 55-62
- [33] Factor analysis of essential and toxic elements in human placentas from deliveries in arctic and subarctic areas of Russia and Norway, J. O. Odland, E. Nieboer, N. Romanova, Y. Thomassen, D. Hofoss, E. Lund, *J. Environ. Monit.*, 2001, 3, 177–184
- [34] Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus, M. Kippler, A. M. Waheedul Hoque, R. Raqibb, H. Öhrvik, E.C. Ekström, M. Vahtera, *Toxicology Letters*, 2010, 192, 162–168
- [35] Elements in Human Placentae in Jamaica, C. Grant, G. Lalor, H. Fletcher, T. Potter, M. Vutchkov, M Reid, *West Indian Med J*, 2010, 59,5, 479-485
- [36] A study of the distribution of aluminium in human placental tissues based on alkaline solubilization with determination by electrothermal atomic absorption spectrometry, P. C. Kruger, L. M. Schell, A. D. Stark, P. J. Parsons, *Metallomics*, 2010, 2, 9, 585-660
- [37] Assessment of Essential and Nonessential Metals and Different Metal Exposure Biomarkers in the Human Placenta in a Population from the South of Portugal, A. Serafim, R. Company, B. Lopes, J. Rosa, A. Cavaco, G. Castela, E. Castela, N. Olea, M. J. Bebianno, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 2012, 75, 867–877
- [38] Toxic and Essential Elements in Placentas of Swedish Women, K. Osman, A. Akesson, M. Berglund, K. Bremme, A.Schutz, K. Ask, M. Vahter, *Clinical Biochemistry*, 2000, 33, 2, 131–138
- [39] Lanthanide distribution in human placental tissue by membrane desolvation-ICP-MS. P. C. Kruger, L. M. Schell, A. D. Stark, P. J. Parsons, *J. Anal. At. Spectrom*, 2010, 25, 1298-1307

- [40] General and applied toxicology, B. Ballantyne, T. C. Marrs, T. Syversen, 2009, Wiley, Barcellona
- [41] Nonredox Nickel Enzymes, M. J. Maroney, S. Ciurli, Chemical Reviews, 2014, 114, 4206-4228
- [42] Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, K. Jomova, M. Valko, Toxicology, 2011, 283, 65–87
- [43] Role of Trace Elements Zinc, Copper and Magnesium During Pregnancy and its Outcome, P. Pathak, U. Kapil, Indian Journal of Pediatrics, 2004, 71, 1003-1005
- [44] In vivo assessment of magnesium status in human body using accelerator-based neutron activation measurement of hands: A pilot study, Aslam, A. Pejovi–Mili, F. E. McNeill, S. H. Byun, W. V. Prestwich, D. R. Chettle, Medical Physics, 2008, 35,2, 608-616
- [45] Magnesium Intake and Incidence of Metabolic Syndrome Among Young Adults, K. He, K. Liu, M. L. Daviglus, S. J. Morris, C. M. Loria, L. Van Horn, D. R. Jacobs, Jr and P. J. Savage, American Heart Association, 2006, 113, 1675-1682
- [46] Selenium, selenoproteins and human health: a review, K. M. Brown, J. R. Arthur, Public Health Nutrition, 2001, 4(2B), 593-599
- [47] Selenium in pregnancy: is selenium an active defective ion against environmental chemical stress?, M. Kantola, R. Purkunen, P. Kroger, A. Tooming, J. Juravskaja, M. Pasanen, K. Seppanen, S. Saarikoski, T. Vartiainen, Environmental Research, 2004, 96, 51–61
- [48] Reduced Selenium Concentrations and Glutathione Peroxidase Activity in Preeclamptic Pregnancies, H. D. Mistry, V. Wilson, M. M. Ramsay, M. E. Symonds, F. B. Pipkin, American Heart Association, 2008, 52, 881-888
- [49] Vanadium: Possible Use in Cancer hemoprevention and Therapy, L. Novotny, S. B. Kombian, Journal of Cancer Research Updates, 2014, 3, 97-102
- [50] Manganese concentrations in maternal–infant blood and birth weight, L. Chen, G. Ding, Y. Gao, P. Wang, R. Shi, H. Huang, Y. Tian, Environ Sci Pollut Res, 2014, 21, 6170–6175
- [51] Effect of Trace Element on First and Multiple Pregnancy, Z. A. M. Al-Jawadi, Z. I. Dallal Bashi, Biosciences Biotechnology Research Asia, 2013, 10 (2), 837-841
- [52] Assessment of Molybdenum Toxicity in Humans, A. Vyskocil, C. Viau, J. Appl. Toxicol, 1999, 19, 185–192
- [53] Chimica Analitica Strumentale, D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, 2009, EdiSES, Napoli, 254-269

[54] F. Romanini, Tesi di Laurea Magistrale in Chimica, Determinazione dei metalli e dello iodio nelle alghe *Salgassum muticum* e *Undaria pinnatifida* della Laguna Veneta con la tecnica ICP-MS, Università di Padova, Anno Accademico 2012-2013

[55] Agilent 7700 Series ICP-MS, Hardware Maintenance Manual, Agilent Technologies, 2010, USA, 1-16

[56] Chimica Analitica Quantitativa, D. C. Harris, 2005, Zanichelli, Bologna

[57] Introduzione alla Chemiometria, R. Todeschini, Milano Chemometrics and QSAR Research Group

[58] sito internet: www.cemmicroonde.it/digestione.html